

Contribution à l'Etude
de l'Action du Lysozyme
sur *H. Pertussis*

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte
de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie
de MARSEILLE

Le 5 Mai 1953

par

Claude GHIGLIONE

Licencié ès-Sciences

Stagiaire de Recherche au C. N. R. S.

né le 26 Août 1929

à Marseille

pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ETAT en PHARMACIE

MM. les Professeurs Examineurs de la Thèse :

C. DUMAZERT, Professeur	Président
H. VIOLLE, Professeur	Assesseurs
Y. DERRIEN, Professeur	»
C. GREBUS, Agrégé	»



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Contribution à l'Etude de l'Action du Lysozyme sur H. Pertuis

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte
de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie
de MARSEILLE

Le 5 Mai 1953

par

Claude GHIGLIONE

Licencié ès-Sciences

Stagiaire de Recherche au C. N. R. S.

né le 26 Août 1929

à Marseille

pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ETAT en PHARMACIE

MM. les Professeurs Examineurs de la Thèse :

C. DUMAZERT, Professeur	<i>Président</i>
H. VIOLLE, Professeur	<i>Assesseurs</i>
Y. DERRIEN, Professeur	»
C. GREBUS, Agrégé	»



PERSONNEL ENSEIGNANT

DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : G. MORIN

Assesseur : J. DELPHAUT

Doyen Honoraire : L. IMBERT

Professeurs Honoraires :

MM. AUBARET, AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GAUJOUX
GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER
RIMATTEI, ROCHE, ROGER

Chargé de Cours Honoraires : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} PERRIN

Professeurs

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique et Carcinologie Clinique	N...
Bactériologie et Pathologie Générale	N...
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	FTOLLE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique	SALMON
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expéri- mentale	DE VERNEJOUL
Clinique Dermato-Syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	PCURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER
Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition	MONGES
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologie	N...
Clinique Ophthalmologie	JAYLE
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histoire Naturelle	N...
Histologie	ROMIEU
Hygiène et Médecine Préventive	VIOLE
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	SAUTET
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE
Pharmacologie	F. MERCIER
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULCZ
Thérapeutique	PIERI

Agrégés libres

MM BERTHIER
AUDIER
BRAHIC
CHOSSON

MM. DOR
FIGARELLA
IMBERT
RECORDIER

Agrégés en exercice

MM. BERNARD
GRANJON
HENRY
JOUVE
LAMY
LAVAL
MARONNEAUD

MM. LENA
MONGES Henri
OLLIVIER
OURGAUD
PACLI
RAYBAUD
VAGUE

Maîtres de Conférence - Agrégés

MM. DONNET
GASTAUT
MOURGUE
PELLISSIER

MM. PICARD
RANQUE
ROUX

Chargés des fonctions d'Agrégés

<i>Clinique Oto-Rhino-Laryngologique</i>	M. CARREGA
<i>Pharmacodynamie et Matière Médicale</i>	M. MERCIER J.

A mon PERE, A ma MERE, A ma FIANCEE,
avec toute mon affection.

AUX MIENS,

A mon Maître, Monsieur le Professeur C. DUMAZERT,

*qui m'a guidé tout au long des années passées au
Laboratoire. Grâce à ses conseils éclairés, j'ai pu
mener à bien ce travail ; qu'il veuille trouver ici
l'expression de ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur J. ROCHE,

Professeur au Collège de France,

*qu'il veuille bien trouver, dans ce travail, un hom-
mage très respectueux et le témoignage de ma plus
sincère reconnaissance, pour la confiance dont il m'a
honoré en acceptant d'être mon parrain au Centre
National de la Recherche Scientifique.*

A Monsieur le Professeur H. VIOLLE,

*qui s'est intéressé à mon travail, et qui a bien voulu
réaliser certaines expériences que je présente aujourd'hui.
Qu'il reçoive ici mes sincères et respectueux
remerciements.*

A Monsieur le Professeur Y. DERRIEN

*qui m'a accueilli dans son Laboratoire. Qu'il veuille
croire en ma sincère et respectueuse gratitude.*

A Monsieur le Docteur C. GREBUS,

*qui m'a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.
Qu'il soit assuré de mon profond respect.*

A mes Maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille,

A mes Camarades du Laboratoire de Chimie
et du Laboratoire de Chimie Biologique
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille,

INTRODUCTION

A. - LE LYSOZYME

Depuis longtemps de nombreux auteurs ont signalé dans les tissus et liquides organiques la présence d'un agent capable de lyser certains corps microbiens en dehors de toute phagocytose. FLEMING (34) en 1922 signale l'action de la salive, des larmes des cartilages, du mucus nasal sur les cocci de l'air, et en particulier sur le *Micrococcus lysodeikticus*. Il rend responsable de la bactériolyse un agent commun à ces humeurs, qu'il d'nomme lysozyme. BLOOMFIELD (8) avait signalé l'action de la salive sur les suspensions de Sarcines ; BORDET (11) montre alors l'action de la sueur sur les microbes de l'air et assimile l'agent lytique responsable au lysozyme de FLEMING.

On observe lorsque l'on fait agir du mucus nasal dilué sur une suspension de *M. lysodeikticus* la lyse des micro-organismes. La lyse est précédée du gonflement des cellules microbiennes entraînant une augmentation de l'opacité du milieu.

Cependant ce matériel est peu actif, donc, à priori peu riche. Dès 1909 LASCHTCHENKO (64) avait observé l'action lytique du blanc d'œuf dilué sur les bactéries du genre subtilis. Le blanc d'œuf contiendrait un principe analogue à ceux rencontrés dans les autres liquides biologiques et cela en quantité telle qu'il représente le meilleur point de départ pour l'extraction.

A l'heure actuelle on définit le lysozyme comme le principe bactériolytique extrait des blancs d'œufs. On l'assimile aux enzymes de propriétés analogues rencontrés dans les autres humeurs sans que l'on puisse à proprement parler l'identifier à eux (BOASSON, 9-10).

De nombreux auteurs ont étudié des substances bactériolytiques obtenues à partir des organismes vivants, autres que les cryptogames et les végétaux supérieurs. Nous signalerons que SUZUKY (93) extrait des leucocytes un produit ayant une action sur les Cocci de l'air. ANDERSON (5) après désintégration par les ultrasons d'*Escherichia Coli* obtient un enzyme capable de lyser les bactéries même par les rayons ultra-violetts. Tous ces produits ont été comparés pour une ou l'autre de leurs propriétés au lysozyme bien qu'ils semblent à priori très différents.

L'effort des chercheurs s'est dirigé tout d'abord vers l'isolement du lysozyme du blanc d'œuf. Depuis 1927 où Wolf (105) signale la première préparation du lysozyme de nombreuses techniques ont été proposées par BORDET (11), MEYER, THOMPSON, PALMER, KHORAZO (71), ROBERTS (84), LINZ (67). Ces techniques ont permis d'obtenir des produits très purs, voire même cristallisés, mais en trop faible quantité pour réaliser leur étude rationnelle.

Il faut attendre 1945 pour que ALDERTON, WARD, FEVOLD (3), ALDERTON ET FEVOLD (2) décrivent des techniques conduisant à des rendements infiniment supérieurs. Elles sont basées soit sur l'adsorption du lysozyme sur une argile colloïdale (bentonite) soit sur la précipitation au pH iso-électrique. Nous reviendrons plus en détail sur leur description car ce sont elles que nous avons utilisées.

Le lysozyme obtenu ainsi en grande quantité, il a été possible de procéder à une étude précise de ses propriétés.

Le lysozyme est une protéine du blanc d'œuf. Il représente environ 4 % des protéines de ce liquide biologique. (3.7 p. 100 d'après WETTER et DEUTSCH (104) - 3.8 p. 100 d'après LONGSWORTH et Col. (68), les premiers déterminant la concentration par précipitation du lysozyme des blancs d'œufs à l'aide d'anticorps spécifiques obtenus chez le rat, les seconds par électrophorèse).

La pureté des préparations peut être contrôlée par électrophorèse, par l'étude de la sédimentation, par la solubilité dans les solutions salines, par précipitation spécifique par une fraction antilysozyme d'un sérum obtenu expérimentalement chez l'animal.

Soluble et thermostable en milieu acide, le lysozyme est insoluble et thermolabile en milieu alcalin. Il ne dialyse pas à travers une membrane de colloïdion. Il est précipité de ses solutions par l'alcool et l'acétone. Il est autérisé par le phénol à 2 p. 100. Il est détruit par les rayons ultraviolets.

La cristallisation du lysozyme a lieu pour une grande zone de pH. Les cristaux sont facilement identifiables (chlorhydrate - bromhydrate - iodhydrate - carbonate). Il cristallise encore plus facilement au voisinage de son pH iso-électrique. L'analyse des sels cristallisés a permis de déterminer le nombre d'atomes de chlore et de brome se combinant à une molécule de lysozyme. ALDERTON et FEVOLD (2) trouvent que 13 atomes d'halogènes se combinent à une molécule de lysozyme à pH 4.0 - 4.3. Le chlorhydrate a été étudié par PALMER et Col. (77) qui ont défini les conditions de cristallisation de ce sel lorsqu'il est préparé à différents pH. Ses propriétés optiques et sa teneur en eau ont été étudiées par JONES (59).

La détermination du point iso-électrique est difficile car le lysozyme se combine avec les sels tampons. ALDERTON, WARD et FEVOLD (33) trouvent $\text{pH} = 10$. — 10,5 valeur en accord avec celle déterminée par FROMAGEOT et SCHNECK (50) pour le minimum de solubilité ($\text{pH} = 10,6 - 10,9$). PASYNSKII et KASTORSKAYA (80) cependant proposent $\text{pH} = 6$.

L'étude de la composition chimique du lysozyme a donné lieu ces dernières années à d'importants travaux dirigés en France par FROMAGEOT (45) (46-47) (48) (49) et aux Etats-Unis par FRAENKEL-CONRAT (40) (41) (42) (43). Ces auteurs estiment avoir à l'heure actuelle nettement précisé la composition de cette protéine en acides aminés. Nous allons citer la composition chimique du lysozyme à titre d'exemple.

Composition du lysozyme d'après FRAENKEL-CONRAT et Col. (43).

	<i>Gr. p. 100</i>	<i>Nombre de radicaux</i>
Azote	18,6	198
Soufre	2,53	11,8
Alanine	5,8	9,7
Arginine	12,7	10,9
Ac. aspartique	18,2	20,4
Cystine	6,8	4,96
Ac. glutamique	4,32	4,36
Glycine	5,7	11,3
Histidine	1,04	1,00
Isoleucine	5,2	5,91
Leucine	6,9	7,84
Lysine	5,7	5,81
Méthionine	2,06	2,06
Phénylalanine	3,12	1,81
Proline	1,40	2,82
Sérine	6,7	9,51
Thréonine	5,5	6,89
Tryptophane	10,6	7,73
Tyrosine	3,58	2,94
Valine	4,8	6,11
Poids moléculaire		14,900

La mobilité électrophorétique a été déterminée par LONGSWORTH et Col. (68), ALDERTON et Col. (3), ANDERSON et ALBERTY (6).

Le spectre ultra-violet a été étudié par FROMAGEOT et SCHNECK (50) par WETTER et DEUTSCH (104), ainsi que par CASELLI (19) qui étudia aussi le spectre ultra-violet du lysozyme oxydé par la tyrosinase.

La composition en azote du lysozyme a été déterminée avec précision par de nombreux auteurs (84) (71) (1) (46) elle est de 18,6 p. 100 pour la protéine précipitée au point iso-électrique (43). Le nombre d'atomes de soufre contenus dans une molécule de lysozyme est égal à 12. Ceci correspond aux 5 molécules de cystine et aux 2 molécules de méthionine de la protéine. Il n'existe pas de groupement SH libre (43) (47) contrairement aux observations de ABRAHAM (1), MEYER et Col. (71).

Le nombre des groupements acides libres déterminé par FRAENKEL-CONRAT et Col. (43) est égal à 6,7, celui des groupements aminés libres est égal à 13,0. Dans cet article les auteurs interprètent leurs résultats et étudient la composition prévisible des chaînes peptidiques de la protéine. Les investigations de GREEN et SCHOEDER (55) (88), THOMPSON (97), JUTIZ et PENASSE (61) ont mis en évidence la lysine comme acide aminé N-terminal. Parmi les 6 radicaux de cet acide aminé que comporte la protéine, un seul aurait cette situation.

Le lysozyme étant un enzyme la recherche des techniques permettant de doser, son activité a été activement entreprise. Les techniques mises au point sont nombreuses et sont fondées sur deux principes différents. Dans un premier groupe on étudie la lyse des microbes vivants ou morts. Dans un second, on étudie la variation de la viscosité d'un milieu constitué soit par des micro-organismes soit par un muco-poly-saccharide microbien.

La première technique décrite dans la littérature est celle de FLEMING (34), cet auteur détermine par dilutions successives celle capable de lyser une suspension de *M. lysodeikticus*. Des méthodes plus perfectionnées surtout par leur standardisation furent décrites. BOASSON (9) fit réellement les premières mesures optiques du trouble au cours de la lyse du *M. lysodeikticus*. Il vit l'importance de l'alcalinité du milieu sur la dissolution des germes après action du lysozyme. La technique qu'il mit au point lui a permis de mesurer l'activité de l'enzyme à 10 % près. La connaissance plus précise de la lyse étant faite, des dosages turbidimétriques furent décrits par MEYER, HAHNEL (70), SMOLENS et CHARNEY (91), CASELLI (18), ALDERTON et FEVOLD (2), FRAENKEL-CONRAT (40), SMOLELIS et HARTSELL (90). PROCTOR et DICKMAN (82) publièrent en 1949 une techni-

que basée sur l'incubation d'une suspension de *Sarcinea lutea* avec le lysozyme. L'action fermentaire est arrêtée par addition d'alcali, l'essai se termine par néphélémétrie ($= 440 \text{ m}\mu$).

Dans le deuxième groupe de techniques il faut essentiellement citer celle proposée par MEYER et HAHNEL (70). Ces auteurs mesurent la variation en fonction du temps de la viscosité d'une solution de muco-poly-saccharide acétylé extrait de *M. lysodeikticus*. L'extraction longue et délicate du substrat enlève de la valeur pratique à ce dosage, mais permet une grande précision et ne met en jeu que de très faibles quantités d'enzyme.

Concurremment aux mises au point de ces techniques, et aussi grâce à elles, les facteurs influençant l'activité de l'enzyme furent étudiés. Ce sont soit des facteurs physiques soit des facteurs chimiques.

Parmi les premiers la température a un effet prépondérant. Elle joue un double rôle ce qui complique le problème de l'interprétation des résultats.

La chaleur agit sur le lysozyme comme sur toutes les protéines, elle le dénature et de ce fait il perd son activité enzymatique. Ce phénomène est lié au pH de la solution. FRAENKEL, CONRAT (40), TAILLAN et STEIN (95), WETTER et DEUTSCH (104), TAILLAN (94) ont observé une modification de certaines propriétés lorsqu'il est conservé un certain temps à la glacière, en milieu alcalin. Les modifications augmentent très rapidement avec l'élévation de la température. Récemment GORINI et FELIX (54) ont étudié le comportement du lysozyme de 60° à 90°. Ces auteurs décrivent l'influence protectrice des ions bivalents et en particulier du manganèse et interprétèrent leurs résultats en admettant que le lysozyme réagit avec l'ion selon le schéma : lysozyme + Mn — lysozyme — Mn, dans laquelle cette deuxième forme serait plus stable que le lysozyme seul, vis-à-vis de la chaleur.

D'autre part, la chaleur est nécessaire pour que l'enzyme agisse sur le substrat. La température étant évidemment en relation avec la vitesse de l'hydrolyse enzymatique. La température optima d'action du lysozyme sur les bactéries et les muco-poly saccharides semble être 55°-60°. Généralement les auteurs n'opèrent pas à des températures élevées et réalisent leurs expériences à des températures égales et souvent inférieures à 45°.

L'action enzymatique varie aussi avec le pH. Nous décrivons plus loin la lyse microbienne par l'enzyme de FLEMING. Nous dirons cependant ici pour faciliter l'exposé que le phénomène peut être divisé en deux. Tout d'abord une hydrolyse partielle de la membrane cellulaire en milieu acide, hydrolyse entraînant une légère augmentation de la turbidité du milieu, suivie en milieu alcalin ou neutre de la lyse totale des germes (75). D'autre part, la libération de certaines substances, la variation de la visco-

sité du milieu sont des critères de l'activité du lysozyme aussi bien que les variations de l'opacité des milieux dans lequel l'enzyme agit.

La diversité des critères d'appréciation de l'activité du lysozyme explique les résultats différents des auteurs déterminant le pH optima d'action de l'enzyme - FLEMING (34), HALLAUER (57), ERMOL'EWA - BUJANOWSKAJA (23), BOASSON (10), THOMPSON (96).

Le lysozyme n'est pas actif en milieu très acide (pH 3) comme l'avait fait remarquer WOLF (105). Cet auteur soulignait une baisse d'activité pour les pH 3,6 à 5,7, cette constatation est normale car nous avons vu que le lysozyme en milieu acide ne diminuait pas, au contraire l'opacité du milieu. MEYER et HAHNEL (70) se basant sur des mesures turbidimétriques trouvent le pH optima d'action 5.5. Le pH le plus favorable à l'apparition du pouvoir réducteur, lors de l'action du lysozyme est pour ces auteurs pH = 4,95.

Le lysozyme ayant un très petit poids moléculaire étant une protéine de caractère basique prononcé est facilement adsorbé par les filtres de porcelaine, le papier, le charbon (FLEMING). WOLF (106) signale son adsorption par l'huile d'olive. MOSS et MARTIN (74) observent l'inhibition de l'activité enzymatique par addition au milieu d'une zéolithe artificielle ou de bentonite. Nous rapprochons cette dernière expérience des constatations précédentes, car l'inhibition est due ici au phénomène physique de l'adsorption (4), (89).

Parmi les facteurs chimiques ayant une influence sur l'activité du lysozyme, nous signalerons les oxydants. FRAENKEL - CONRAT (39) montre que le lysozyme est inhibé par l'iode et réactivé réversiblement par le sulfite de sodium ou le thio-glycol. GALSTON (52), ayant constaté l'inactivation de divers enzymes végétaux par insolation en grande lumière en présence de riboflavine observe dans les mêmes conditions, pour le lysozyme une perte de 40 p. 100 de son activité. CASELLI et KERTESZ (20) (63) étudient l'oxydation du lysozyme à travers une membrane de cellophane par la tyrosinase (système polyphénol oxydase-O-dihydroxyphénol). Le lysozyme devient rouge, perd en 3 heures 50 p. 100 de son activité, ceci est totalement réversible : par réduction à l'aide de l'hyposulfite de sodium le produit oxydé redevient incolore, l'activité initiale réapparaît.

Les sels minéraux sont des effecteurs importants. Leurs pouvoirs dépendent de leur nature et de leur concentration. Le plus important est le chlorure de sodium, WOLF (105). Cet auteur le trouve indispensable à la lyse pour des concentrations inférieures à 8 gr. par litre.

MEYER et HAHNEL (70) admettent que cette concentration peut s'élever jusqu'à 14 gr. par litre sans modification notable de l'activité du lysozyme.

PROCTOR et DICKMAN (82) observent qu'à cette concentration le chlorure de sodium n'est pas inhibiteur de la lyse microbienne mais que des concentrations plus élevées (29,5 g. p. 1.000 - 58,5 g. p. 1.000) entraînent une forte inhibition (respectivement 50 p. 100 - 90 p. 100 d'inactivation).

BOASSON (9) a étudié l'action du sulfate de potassium, du ferrocyanure de potassium, du chlorure de calcium, sur l'activité de l'enzyme. Certains auteurs ont signalé l'action inhibitrice des chaînes organiques (74) ; cette action croît avec le nombre d'atomes de carbone. L'inhibition est réversible. On peut se débarrasser de l'agent inhibiteur en le précipitant sous forme de dérivé du baryum, du calcium ou même par simple dialyse. L'inhibition du lysozyme entraîne une modification de la structure moléculaire mise en évidence par électrophorèse.

H. VIOLLE (100) a récemment montré que l'injection de solution de lysozyme à des cobayes et à des lapins avait pour effet d'augmenter la coagulabilité du sang de ces animaux. Au-dessus d'une certaine dose l'effet coagulant n'est pas plus prononcé mais la durée de l'action s'est accrue. Le lysozyme agit lorsqu'il est injecté (voie sous-hypodermique, intraveine) ainsi que lorsqu'il est ingéré. Le lysozyme n'agit pas « in vitro » sur la coagulabilité du sang.

Cet enzyme n'a aucun effet anaphylactisant, il n'est pas de nature allergisante.

C. DUMAZERT et nous-même (24) avons mis en évidence l'antagonisme de l'héparine et du lysozyme « in vivo ». L'héparine rend incoagulable le sang des chiens mis en expérience, l'injection de lysozyme fait revenir, après une légère période de latence, la vitesse de coagulation du sang de ces animaux à une valeur normale. Ceci peut s'expliquer par une combinaison héparine - lysozyme, telle que celle que l'on peut observer « in vitro ». Le lysozyme a une action analogue, dans ce phénomène, à certaines protamines, par exemple la salmine (79) qui possèdent des structures chimiques voisines (poids moléculaire faible - caractère basique prononcé).

Après avoir rappelé les propriétés sérologiques et immunologiques de l'enzyme, nous décrirons son action sur les micro-organismes. Bien que le lysozyme ne puisse être classé dans la longue série des antibiotiques, son action sur les micro-organismes est intéressante à plus d'un titre, à étudier. En effet, si l'on considère les humeurs (larmes, mucus nasal, salive)

qui le renferment ou qui renferment un enzyme analogue il doit jouer un rôle actif dans la protection de l'individu attaqué à tout instant par les microbes de l'atmosphère. Le lysozyme agit « in vitro » sur de nombreux germes pathogènes ou non. Les micro-organismes les plus sensibles sont les germes banaux de l'air et en particulier les cocci (WEBB, 101) ; *M. lysodeikticus* ainsi que *Sarcinea lutea* sont totalement lysés et c'est surtout à eux que l'on s'adresse pour l'étude cinétique de la lyse. Cependant d'autres germes sont sensibles. Nous citerons *Bacillus subtilis*, *Escherichia Coli.*, *Clostridium Welchii*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus megatherium* (15) (23) (101) (103).

Une revue générale des germes sensibles à l'action du lysozyme a été publiée par REYNOLDS (83). Nous avons observé et étudié au cours de notre travail l'action du lysozyme sur *Hemophilus Pertusis*.

L'étude du mécanisme de l'action du lysozyme sur les bactéries sensibles soulève le problème du pouvoir enzymatique de cette protéine. Depuis les premiers travaux de FLEMING de nombreux chercheurs se sont attachés à ce problème. Nous allons essayer de rappeler l'essentiel des résultats acquis.

On observe, lorsque l'on fait agir le lysozyme sur une suspension microbienne, un gonflement des cellules des micro-organismes, entraînant une augmentation de l'opacité du milieu (BOASSON, 9). Cette augmentation d'opacité n'est visible qu'en milieu acide, un pH alcalin entraînant une dissolution des corps cellulaires (NAKAMURA, 75). Ceci est vrai, aussi bien pour les microbes vivants que pour les microbes tués d'une manière douce (53), car une technique modifiant profondément le contenu cellulaire dénature, évidemment, le substrat du lysozyme (27) (53). Le lysozyme n'est pas consommé au cours de la lyse (FLEMING et ALLISON, 34 bis). On peut récupérer l'enzyme, en totalité, après l'avoir mis en contact avec des micro-organismes. Il peut agir une deuxième fois sans voir diminuer son activité.

Ce gonflement cellulaire, suivi d'une dissolution des corps microbiens en milieu alcalin après l'action de l'enzyme est une première démonstration de l'activité du lysozyme sur un germe. La membrane cellulaire au cours de la lyse ne disparaît pas, il n'y a seulement qu'une modification de sa structure. Elle devient perméable aux produits cytoplasmiques qui peuvent ainsi diffuser dans le milieu extérieur.

Ce phénomène se traduit par une augmentation considérable de la viscosité, puis d'une fluidification (15). Lorsque la suspension de germes est assez forte on peut obtenir une prise en masse sous forme de gel, gel qui, au bout de 2 heures à 37°, disparaît. L'opacité de la suspension microbienne ne disparaît pas au cours de la fluidification du milieu. Cette

II. - ISOLEMENT D'UNE SUBSTANCE DE NATURE GLUCODIQUE A PARTIR D'H. PERTUSIS

Les résultats acquis précédemment nous ont permis d'entreprendre l'isolement de quantités importantes de produits de nature glucidique que nous avons mis en évidence dans la première partie de notre travail lorsque nous avons fait agir le lysozyme sur des suspensions d'*H. pertusis*.

Le principe de notre technique d'isolement consistera donc d'après nos expériences d'orientation à faire agir le lysozyme sur des suspensions de germes, à laisser incuber un certain temps à 45° à pH 5.6, puis à déprotéiniser le milieu par l'acide trichloracétique. L'addition d'alcool fort au filtrat de déprotéinisation permet enfin de précipiter la substance que nous voulons isoler en vue de poursuivre l'étude de sa constitution chimique, et en particulier de sa partie glucidique.

Nous allons décrire le mode opératoire que nous avons adopté : dans une fiole d'Erlenmeyer d'un litre on place une suspension microbienne d'*H. pertusis*. Cette suspension est constituée par les micro-organismes obtenus après ensemencement de 5 boîtes de ROUX suivant la technique décrite précédemment.

Le volume de la suspension est de 200 cm³. On ajoute 150 mgrs de lysozyme en solution dans de l'eau légèrement acidulée. Le volume est porté à 230 cm³ par addition d'eau physiologique ; le pH est amené à 5.8 par de l'acide acétique N. On laisse la réaction s'opérer pendant une heure et demie à 45°C. On constate que les masses glaireuses caractéristiques du bacille de BORDET se dilacèrent, gonflent peu à peu et se solubilisent. Le contrôle de l'action enzymatique peut se faire en cours d'expérience. On prélève une petite fraction (2 cm³ environ) du milieu auquel on ajoute un volume double de solution N de soude. Lorsque l'opération est terminée la suspension prélevée s'éclaircit en milieu alcalin.

On arrête l'action du lysozyme par addition de 250 cm³ de solution à 20 p. 100 d'acide trichloracétique. On centrifuge pour éliminer les produits insolubles.

La liqueur surnageante est recueillie et à son tour additionnée de 1,5 litre d'alcool à 95°. Un précipité se forme. On le laisse décanter 12 heures à 4°C. On recueille la substance insoluble par centrifugation. On la lave deux fois avec de l'alcool à 95° et une fois avec de l'éther anhydre.

La quantité de substance isolée par cette technique varie entre 400 mgr et 500 mgr. Le poids sec des microbes mis en jeu pour obtenir de telles quantités est compris entre 1,1 gr et 1,3 gr.

Comme nous le verrons au cours de l'exposé de notre travail la substance que nous avons isolée est en majeure partie constituée de glucides. Nous avons donc été conduits à rechercher s'il restait dans les produits insolubles dans l'acide trichloracétique une forte proportion de glucides, ceci afin de contrôler la valeur de notre technique d'isolement.

Après chaque opération nous avons redissout le précipité obtenu par action de l'acide trichloracétique dans 100 cm³ de solution N de soude. Après hydrolyse en milieu acide (à l'autoclave 120° pendant une heure) d'une fraction aliquote (10 cm³) de la liqueur ainsi obtenue, nous avons dosé les sucres réducteurs par la méthode de LEWIS et BENEDICT (65) et par celle de HAGEDORN et JENSEN (56).

Tout calcul fait, nous trouvons qu'il existe (en exprimant nos résultats en glucose) 17 à 35 mgrs de substances glucidiques non solubles dans l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Nous pouvons donc conclure que seule une faible quantité de glucides n'est pas isolée par notre technique soit 6 p. 100 en moyenne du poids de la substance glucidique que nous avons isolée.

III. - ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ET DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DE LA SUBSTANCE GLUCIDIQUE ISOLÉE D'H. PERTUSIS

Le produit isolé se présente sous forme d'une poudre blanche, donnant avec l'eau une épaisse solution colloïdale qui s'éclaircit notablement en milieu alcalin (pH = 8). Il est précipitable de ses solutions par addition d'alcool fort. Les analyses que nous allons décrire ont été réalisées sur un échantillon moyen provenant du mélange des produits obtenus à la suite de plusieurs isollements.

Le charbonnement de la substance chauffée à forte température montre que nous avons à faire à un produit organique - après calcination dans un creuset en platine on n'obtient qu'une quantité pratiquement négligeable de cendres (1,2 p. 100.)

Nous avons pu identifier dans le produit par les procédés classiques de l'analyse élémentaire l'azote et le soufre, ce dernier en très faible proportion. La recherche du phosphore a été négative.

La substance donne une réaction de MOLISH (β - naphthol en présence d'acide sulfurique concentré) positive. La solution de la substance ne réduit pas la liqueur de Fehling à l'ébullition, mais la solution obtenue après hydrolyse du produit en milieu sulfurique au bain-marie bouillant réduit à chaud la liqueur cupro-potassique. Nous avons donc bien à faire à un produit glucidique, les oses étant impliqués sous forme de polysaccharide.

Le produit soumis à l'hydrolyse (autoclave 120°) en présence d'acide sulfurique conduit à une liqueur qui donne avec la ninhydrine une réaction positive. La réaction de MILLON (caractéristique des groupements phénols) ainsi que la réaction de SAKAGUSHI (caractérisation des groupements guanidiques) sont positives. Il existe donc bien à côté de la fraction glucidique de la substance une fraction protéique.

La réaction alloxurique étant douteuse nous ne pouvons conclure à la présence ou à l'absence de bases puriques ou pyrimidiques. La recherche de ces corps sera reprise au cours de notre travail par d'autres procédés.

Ces expériences d'orientation nous ont montré que le produit est constitué de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et de soufre ; essentiellement sous forme de glucides et de protides et éventuellement sous forme de constituants nucléiniques. Ceci nous a conduit à rechercher quelles étaient les proportions de glucides et d'azote existant dans le produit isolé.

Les glucides étant sous forme de polysaccharides une hydrolyse préalable est nécessaire. Elle s'est effectuée sur une fraction de l'échantillon (50 mgr). Cette prise d'essai a été hydrolysée à l'autoclave à 120° pendant une heure, en présence d'acide sulfurique en solution normale. On neutralise exactement l'hydrolysât au moyen d'une solution à 40 gr pour 100 de soude ; on porte à volume connu, le dosage est réalisé sur une fraction aliquote par la méthode de HAGEDORN et JENSEN (56). Tout calcul fait, la moyenne des essais effectués nous permet de conclure que la substance contient 56 p. 100 de glucides exprimés en glucose (substance sèche et sans cendre). Le dosage de l'azote a été effectué par micro-kjeldahl. La moyenne des résultats des essais nous permet de conclure que la substance contient 7 p. 100 d'azote (substance sèche et sans cendre).

En résumé le produit isolé est constitué en majorité de substances glucidiques. Si nous admettons que l'azote est amené par un constituant protéique contenant 16 p. 100 de son poids en azote (comme la majorité des protéines) nous constatons que le pourcentage donné par le calcul (soit 43,7 p. 100) correspond avec une bonne approximation à la fraction non glucidique de la substance isolée. Cependant, la preuve de la présence de bases puriques et pyrimidiques n'ayant été faite, il est possible qu'une partie de l'azote se trouve sous cette forme.

L'analyse qualitative que nous avons entreprise a été destinée :

- 1° à identifier les constituants glucidiques de la substance ;
- 2° à rechercher des constituants nucléiques éventuels ;
- 3° à identifier quelques constituants aminés de la fraction protéique.

1° RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES SUBSTANCES DE NATURE GLUCIDIQUE.

Nous venons de voir que la substance isolée contient une très forte proportion (environ 60 p. 100) de glucides sous forme de polysaccharide. Nous décrirons donc tout d'abord, la technique qui nous a permis d'hydro-

lyser ce produit. La solution provenant de l'hydrolyse a été analysée. Elle a permis de procéder tout d'abord aux réactions colorées classiques des sucres. Nous avons ensuite identifié les glucides au moyen de leur osazone et à l'aide de la spectrophotométrie d'après la technique de SORENSEN et HOCGARD. Enfin pour confirmer et préciser toutes ces données nous avons soumis l'hydrolysate à l'analyse par la méthode de la chromatographie sur papier.

1° Hydrolyse de la substance glucidique :

250 mgrs de produit sont chauffés à l'autoclave à 120°C pendant une heure en présence de 25 cm³ de solution N d'acide sulfurique l'hydrolysate est neutralisé par 1,5 gr de carbonate de calcium, les sels de Ca insolubles précipitent et sont éliminés par centrifugation, le précipité est lavé deux fois à l'eau distillée. Les liqueurs sont rassemblées, décolorées à l'ébullition par du charbon activé. La liqueur ainsi obtenue est soumise à l'analyse.

2° Réactions colorées classiques des sucres :

La solution obtenue après hydrolyse a permis de procéder à diverses réactions colorées d'identification des sucres.

La réaction de BIAL (orcine chlorhydrique) caractéristique des pentoses est négative ainsi que celle de SELIVANOFF (à la résorcine chlorhydrique) caractéristique des cétooses. Il en est de même de la réaction de TOLLENS (à la naphto-résorcine chlorhydrique) caractéristique de l'acide glucuronique et de celle d'ELSON et MORGAN caractéristique de la glucosamine (condensation avec l'acétyl-acétoe en milieu alcalin suivie d'addition de para-diméthyl-amino-benzaldéhyde en milieu chlorhydrique). Seule la réaction de la phluoroglucine chlorhydrique caractéristique des aldoses, est positive.

Nous nous trouvons donc probablement en présence d'aldohexoses que nous allons essayer d'identifier.

3° Identification par la formation d'osazone :

La formation de l'osazone se fait selon la technique de DENIGES appelée par DUMAZERT et LEVY (25).

L'hydrolysate est préparé comme il l'a été précédemment écrit. La solution ainsi obtenue est concentrée au bain-marie bouillant jusqu'à un volume approximatif de 5 cm³ (correspondant à environ 125 mgr de glucides).

Le réactif à la phényl-hydrazone est additionné à cette liqueur. Le mélange est abandonné 2 heures à la glacière. Il ne se forme pas de précipité d'hydrazone, ce qui élimine à priori la présence du mannose. On chauffe alors 30 minutes au bain-marie bouillant, au bout de ce temps on voit apparaître à chaud un précipité cristallin. L'examen microscopique du précipité montre de beaux cristaux jaunes en gerbes de blé caractéristiques de la glucosazone.

Nous avons préparé d'une manière identique de la glucosazone pure à partir de glucose. Les deux substances ont été comparées. Elles fondent au bloc de Maquenne à 231° - 232° (point de fusion instantané), en outre, l'addition d'osazone étudiée à la glucosazone pure ne fait pas varier le point de fusion de cette dernière.

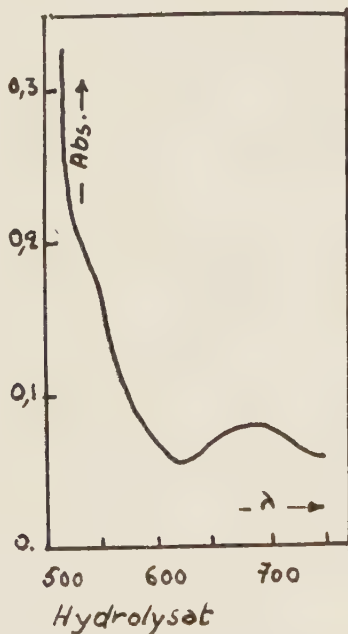
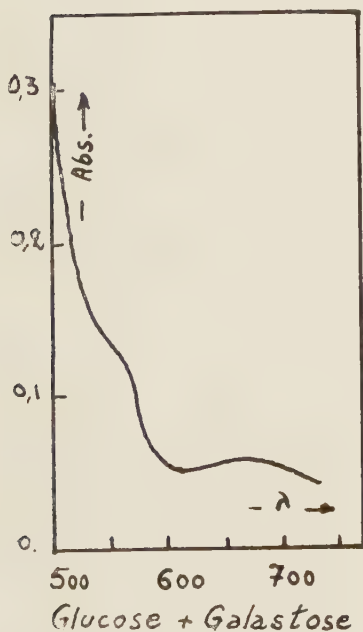
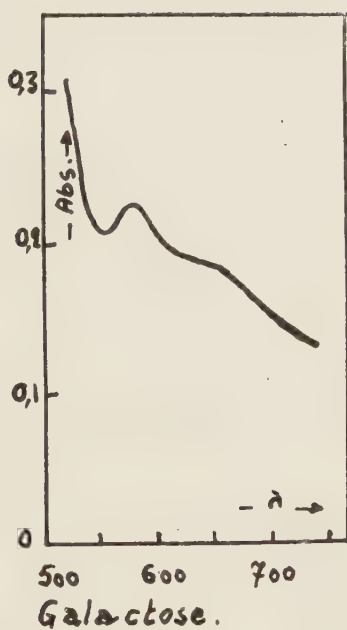
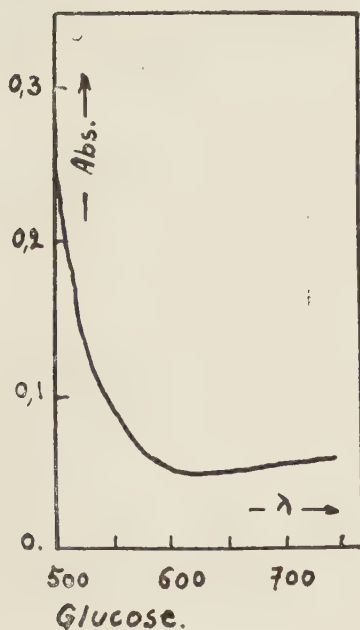
L'ensemble de ces résultats peut se résumer ainsi : nous avons isolé de la glucosazone de l'hydrolysate de la substance glucidique extraite d'*H. pertusis*. Cette osazone ne peut avoir, pour ose générateur, ni le fructose, ni la glucosamine puisque les réactions de SELIVANOFF, d'ELSON et MORGAN ont été négatives. Nous pouvons également éliminer le mannose en nous basant sur l'absence de précipitation de notre liqueur finale par la phényl-hydrazone à froid. Cependant comme la mannose hydrazone n'apparaît que dans des solutions de mannose suffisamment concentrées, la possibilité de la présence de cet aldose en faible quantité n'est pas exclue, d'autre part, il est possible qu'il se trouve un autre aldohexose dans l'hydrolysate, mais en proportion minime. Il ne fournirait que très peu d'osazone par rapport à la glucosazone obtenue et ainsi malgré le soin apporté à notre expérience nous ne l'aurons pas identifié.

De cette expérience, il résulte néanmoins que la présence de forte quantité de glucose, dans la substance, est démontrée.

4° Identification des sucres à l'aide de la spectro-photométrie (Brucker [14]).

Pour identifier de faibles quantités d'un ou d'autres aldoses qui auraient pu échapper à notre recherche nous avons cru bon de nous adresser à une technique plus sensible. Nous avons utilisé celle décrite par BRUCKNER (14), cet auteur utilisant la réaction signalée par M^{me} SORENSEN et HOGGARD pour le dosage des glucides en milieu protéique. Le principe est le suivant : l'orcinol, en milieu acide sulfurique concentré, donne en présence de chaque ose simple une coloration dont le spectre dans le visible est caractéristique de ce sucre.

La solution à étudier est constituée d'un hydrolysate de 10 mg de substance glucidique dans 50 cm³ d'eau.



La figure I donne la présentation du spectre d'absorption de la liqueur obtenue à la suite de la condensation des sucres de cette solution et de l'orcine sulfurique. Ce spectre ne correspond à aucun ose simple. L'étude du graphique nous conduit à envisager un mélange de deux oses : glucose et galactose.

Connaissant la forte proportion de glucose par rapport à l'hexose inconnu nous avons réalisé la solution de composition suivante :

glucose = 4,5 mgr p. 100

galactose = 0,5 mgr p. 100

La figure I donne la représentation du spectre d'absorption de la liqueur obtenue à la suite de la condensation des sucres de cette solution et de l'orcine sulfurique. Nous constatons que ce graphique est superposable à celui correspondant à l'hydrolysât.

En résumé, cette expérience permet de conclure que le glucose est le constituant existant en proportion prédominante dans l'hydrolysât étudié, et qu'il est accompagné d'une faible quantité d'un ose différent. Il nous paraît logique d'envisager la présence probable d'une faible quantité de galactose.

5° Séparation chromatographique des aldo-hexoses.

Dans le but de préciser ces premières données, nous avons soumis des hydrolysats à l'analyse selon la méthode de la chromatographie sur papier.

Bien que cette méthode soit récente, elle a été suffisamment décrite pour être aujourd'hui classique (60). Elle a été appliquée pour la première fois à l'analyse des ose par PARTRIDGE (78).

Nous avons utilisé un appareillage inspiré de celui décrit par JERMYN et SHERWOOD (58).

Le solvant utilisé est celui préconisé par PARTRIDGE (78) :

- 40 cm³ de n. butanol purifié par distillation et desséché ;
- 10 cm³ d'acide acétique glacial, purifié par cristallisation ;
- 50 cm³ d'eau distillée.

On agite, et on laisse décanter 10 heures, on soutire soigneusement la couche inférieure aqueuse, la couche supérieure est alors prête à être utilisée.

Nous nous sommes servis du papier DURIEUX n° III, le papier ayant été préalablement lavé par une chromatographie « à blanc ».

Nous avons opéré à la température du laboratoire (16° - 20°) pour une bonne séparation des sucres nous avons réalisé les chromatographies pendant des temps assez longs (3 à 6 jours). La révélation des chromatogrammes a été faite à l'aide de nitrate d'argent ammoniacal préparé selon BOULANGER et BISERTE (13) :

solution 0,1 N de nitrate d'argent dans de l'ammoniaque 5 N

On chauffe à 105° - 110° dans une étuve pendant 5 à 10 minutes le papier imprégné de cette liqueur.

Cette technique de révélation présente les deux inconvénients suivants :

- 1° Exposé à la lumière le papier noircit très rapidement, ce qui rend impossible la conservation du document ;
- 2° Les taches ont souvent une faible intensité.

Incidentement nous avons remédié à ces deux inconvénients d'une part en fixant le chromatogramme au moyen de l'hyposulfite de soude, d'autre part, en renforçant l'intensité des taches par le chlorure mercurique.

La technique que nous avons ainsi mise au point est la suivante : le chromatogramme étant révélé de la façon ordinaire, on fait dissoudre le nitrate d'argent non réduit dans une solution concentrée d'hyposulfite de sodium de composition suivante :

Hyposulfite de soude	300 grs
Sulfite de soude	15 grs
Eau q.s.p.	1.000 cm ³

Le papier est laissé trois minutes dans ce réactif, puis lavé cinq minutes dans un courant d'eau distillée. Il ne reste sur le papier que les taches d'argent réduit. On augmente la coloration de ces taches par formation d'un complexe brun donné par l'argent et le mercure.

On place le papier lavé dans le réactif suivant :

Chlorure mercurique	30 grs
Bromure de potassium	30 grs
Eau q.s.p.	1.000 cm ³
(faire dissoudre les sels dans l'eau chaude 60°C).	

Le papier se décolore complètement. On le lave à nouveau dans un courant d'eau, de manière à dissoudre l'excès du sel de mercure. Le complexe est alors réduit dans le bain suivant :

Lessive de soude	100 cm ³
Formol (solution à 20 %)	250 cm ³
Eau q.s.p.	1.000 cm ³

Les taches apparaissent de nouveau avec une coloration brune très intense. Le chromatogramme est alors fixé, les taches renforcées. Cette technique facile permet de conserver des chromatogrammes indéfiniment sans que les taches soient altérées.

Les résultats des chromatogrammes s'expriment en déterminant les RF des substances que l'on soumet à l'analyse. Ces RF sont alors comparés aux RF des corps purs. Le RF d'un corps est défini comme le rapport de la distance parcourue par un glucide à la distance parcourue par le front du solvant, la température doit être constante pendant toute l'opération et ne varier que de $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$.

Pour obtenir une bonne séparation des oses nous avons été conduits à réaliser des chromatographies pendant 3 à 6 jours — nous n'avons pas de papier assez long pour pouvoir mesurer avec exactitude la distance parcourue par le solvant, ni d'enceinte nous permettant d'avoir une température rigoureusement constante. Nous avons exprimé nos résultats d'une manière différente pour qu'ils puissent être comparés entre eux. Nous avons pris une substance de référence : le glucose. Nous avons défini le Rg : rapport de la distance parcourue par un glucide à la distance parcourue par le glucose, le Rg du glucose étant donc par définition égal à l'unité.

100 mg. de la substance sont hydrolysés selon la technique décrite page 37, la solution obtenue est ainsi privée d'ions minéraux que gêneraient la chromatographie, elle est concentrée sous vide à basse température (50°C) jusqu'à un volume approximatif de 1 cm³. Ce sont des microgouttes (2 mm³) (0,1 mg de glucides) de cette solution qui sont soumises à l'analyse.

Nous avons observé après la révélation des chromatogrammes deux taches, la première très nette, intense, correspond à un ose que nous avons appelé A qui migre plus rapidement que le second que nous nommerons B, celui-ci donne une tache peu intense se terminant vers le haut du chromatogramme par une très faible traînée.

Les distances parcourues par ces sucres ont pu être déterminées en fonction du temps. Nous pourrions les comparer avec les distances par-

courues par les sucres de référence. Les résultats sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Distances parcourues (en cm.) par les sucres A et B et les sucres de référence, en fonction des temps des chromatographies.

	3 jours	5 jours	6 jours
Ose A	9.5	10.4	12.5
Ose B	8.3	8.6	10.5
Xylose	16.2		
Levulose	11.9		
Mannose	11.9		
Glucose	9.5	10.2	12.4
Galactose	8.1	8.6	10.5

Ces résultats nous ont permis de calculer les Rg des différents sucres ; ces valeurs sont rassemblées dans le tableau n° VIII.

TABLEAU VIII

Valeur des Rg des sucres A et B et des sucres de référence.

SUCRE	Rg
Galactose	0.84
Glucose	1.
Mannose	1.25
Levulose	1.25
Xylose	1.70
Ose A	1.01
Ose B	0.85

De l'examen de ces résultats il ressort qu'il existe dans l'hydrolysate de la substance glucidique que nous avons isolée au moins deux oses en quantités décelables par les techniques que nous avons utilisées. Ces oses ne sont ni des pentoses, ni des cetoses. Les sucres mis en évidence sont des aldohexoses, aucun des deux n'est identifiable avec le mannose, d'autre part, l'examen des Rg des sucres A et B nous permet de comparer ces sucres avec le glucose et le galactose. En effet, les valeurs trouvées pour le sucre A et le glucose (Rg ose A — 1,01 — Rg glucose = 1) le

sucres B et le galactose (R_g ose B = 0,85 — R_g galactose = 0,84) sont en excellent accord et nous permettent d'identifier deux à deux ces substances.

En résumé l'analyse chromatographique de l'hydrolysats conduit à

mettre en évidence deux sucres, le glucose et le galactose ; l'intensité des taches lors de la révélation des chromatogrammes nous permet de dire que le glucose est en quantité supérieure.

Ces résultats venant confirmer ceux de l'analyse chimique nous permettent d'affirmer qu'il existe dans la substance glucidique que nous avons isolée par action du lysozyme deux sucres : le glucose et le galactose et que le premier existe en quantité très supérieure au second.

2° RECHERCHE DE CONSTITUANTS DE NATURE NUCLEIQUE.

Lorsque nous avons décrit les essais analytiques préliminaires auxquels nous avons soumis la substance, nous avons signalé que la réaction alloxurique (caractéristique des bases puriques et pyrimidiques) était douteuse. Par ailleurs, l'absence de phosphore et de pentoses constatée lors de nos premiers essais analytiques nous permet déjà d'éliminer la présence des acides nucléiques.

Cependant, OVEREND et col. (76) ont isolé des acides desoxyribonucléiques à partir de souches pathogènes et non pathogènes d'*H. pertusis*. Ces acides nucléiques étant étroitement liés à des polysaccharides. D'une part, nous avons montré que notre méthode permettait d'extraire la totalité des substances glucidiques des germes, d'autre part, nous connaissons les caractères de solubilité des acides nucléiques (solubles dans l'eau en milieu acide, précipitables de leur solution, à froid, par l'alcool fort) caractères analogues à ceux de la substance que nous avons isolée.

Ces observations nous ont amené à rechercher non pas les acides nucléiques (car les essais préliminaires ont montré leur absence) mais certains constituants nucléiques : les bases puriques et pyrimidiques.

Nous avons utilisé la technique préconisée par KERRSERAI-DARIAN et WARGON (52). Le principe de cette méthode est le suivant : les acides nucléiques ou les substances qui en renferment sont hydrolysés en milieu acide. On sépare les constituants puriques et pyrimidiques par leur différence de solubilité de leur sel d'argent. Après une deuxième hydrolyse et élimination de l'ion Ag, les deux liqueurs sont

hydrolysées. On détermine leur spectre d'adsorption dans l'ultra violet. Ceci permettant d'étudier quantitativement et qualitativement les bases puriques et pyrimidiques contenues dans ces solutions.

Nous avons tout d'abord analysé un mélange constitué de 25 mg d'acides nucléiques de levure de bière et de 75 mg de glucose.

La courbe A et la courbe B de la figure II donnent la représentation des spectres d'adsorption pour des longueurs d'onde comprises entre 240 et 280 m μ de la solution contenant des bases puriques et de la solution contenant les bases pyrimidiques.

Ces résultats confirment ceux des auteurs de la méthode.

Nous avons ensuite analysé 50 mg de la substance isolée d'*H. pertusis*.

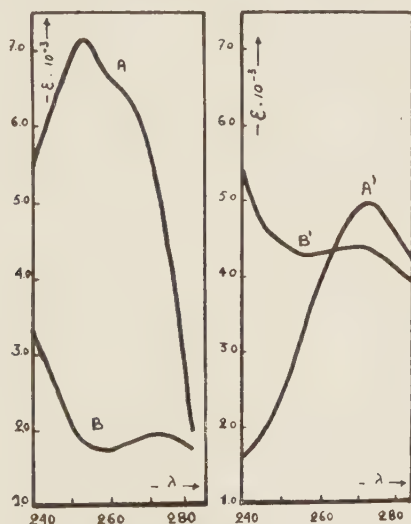


fig II

Les courbes B et B' de la figure II donnent la représentation des spectres d'adsorption des solutions correspondant à celles des bases puriques et des bases pyrimidiques.

L'examen de ces résultats montre l'absence des bases puriques et pyrimidiques dans le produit isolé.

Note. — GABRIELSKI et MARCHIEWSKI (51), BOSH et ANDERSON (12) ont étudié l'adsorption dans l'ultra-violet des solutions d'oses. Ces auteurs ont montré que les solutions de sucre possédaient une faible adsorption maxima pour les longueurs d'onde comprises entre 270

et 280 m μ . Il semble donc que l'on peut rendre les oses de la substance glucidique responsables des spectres d'adsorption représentés par les courbes B et B'.

3° RECHERCHE DE QUELQUES CONSTITUANTS PROTEIDIQUES.

§7

Nous savons qu'il existe dans le produit que nous avons isolé outre une fraction glucidique une fraction protéique. C'est cette fraction que nous avons brièvement étudiée.

Nous avons cherché à identifier par chromatographie sur papier quelques-uns des acides aminés qui constituent la protéine.

La chromatographie sur papier des acides aminés de la protéine a été réalisée dans un appareil identique à celui indiqué pour la chromatographie sur papier des sucres. Le solvant utilisé est celui de PARTRIDGE (voir p. 40). Le papier utilisé est du papier WATHMANN n° 1, la révélation se fait en pulvérisant une solution à 0,2 p. 100 de nynhydrine dans le butanol, puis en chauffant à 80°C pendant quelques minutes. Les chromatographies ont été réalisées pendant des temps de l'ordre de 24 heures. Les chromatographies sont à une dimension.

La solution que nous avons soumise à l'analyse par chromatographie sur papier est constituée par un hydrolysate de la substance, préparé de la manière suivante :

10 mg du produit sont chauffés à 110° pendant 24 heures en tube scellé en présence de 2 cm³ de solution 6N d'acide chlorhydrique. La liqueur ainsi obtenue est décolorée par du charbon activé. La solution est alors évaporée au bain-marie bouillant, puis reprise par l'eau et évaporée à nouveau ; ces opérations sont réalisées plusieurs fois pour qu'il ne reste plus trace d'acide chlorhydrique.

Le volume final de la solution est de 0,5 cm³, une microgoutte (0,2 mm³) est soumise à l'analyse.

Les acides aminés que nous avons identifiés en étudiant leur distance de déplacement en 24 heures et leur R_F sont les suivants :

- acide aspartique,
- acide glutamique,
- serine,
- glycine,
- thréonine,
- alanine.

Nous avons des présomptions sur la présence de la cystine.

Enfin une tache de RF moyen 0,84 a été obtenue, elle est constituée par un mélange d'acides aminés qui ne peuvent être identifiés avec précision par chromatographie à une dimension.

Nous ne pouvons préciser davantage ces résultats. L'hydrolyse acide en présence de quantité assez forte de glucides détruisant certains constituants.

En résumé cette expérience montre que le produit isolé par action du lysozyme sur *H. pertusis* est constitué à côté d'une fraction glucidique d'une partie protéidique. Cette ou ces protéines sont constituées de nombreux acides aminés dont nous n'avons pu identifier avec sûreté qu'un très petit nombre.

variation de la viscosité se présente même pour les germes peu sensibles (15) et est un caractère démonstratif de l'action du lysozyme sur ces germes.

De nombreuses questions se posent pour l'interprétation chimique de ces phénomènes. L'analyse des produits finaux de la lyse a été entreprise (57) (71) (81). On observe l'apparition d'un pouvoir réducteur d'azote non protéique, de phosphate sous forme minérale, ainsi que des acides nucléiques (CALIFANO, 15), ceci entraînant, pour le microbe, la perte de son pouvoir tinctorial à la coloration de Gram (WEBB, 10!) chez par exemple *Cl. Welchii*, *St. Aureus*, *St. Faecalis*.

HALLAUER (57), MEYER et Col. (70) (71) ont pensé que l'enzyme agissait sur les mucopolysaccharides, hydrolysant certaines liaisons spécifiques et aussi libérant le polyose de ses liaisons chimiques avec le reste du cytoplasme. Cette première phase semble grandement facilitée par la chaleur. (CAVALLO, 21). MEYER et Col. (70) ont isolé alors le polysaccharide du *M. lysodeikticus*. Leurs travaux ont permis de mettre en évidence et d'étudier avec précision la dépolymérisation du polyholoside par l'enzyme. Ceci étant spécifique de l'acetyl-amino-polysaccharide, le lysozyme étant inactif sur le polysaccharide désacétylé. Cette dépolymérisation secondaire faisant suite à une hydrolyse partielle, entraîne la chute de la viscosité du milieu. Certains auteurs (70) ont montré qu'une troisième phase existait — le lysozyme agit comme une glucosidase — ceci entraîne la libération de groupements réducteurs et de groupements aminés. Les deux fonctions : dépolymérase et glucosidase sont différenciées par leur pH optima d'action et par leurs effecteurs minéraux.

C'est cette dualité d'action qui fait classer à l'heure actuelle le lysozyme à côté d'un autre enzyme mucolytique : la hyaluronidase. Ces deux enzymes ayant un certain nombre de points communs, inhibition reversible par oxydation, dépolymérisation du substrat sans libération notable de groupements réducteurs.

Les chlorures sont indispensables à leur fonction de dépolymérase, alors qu'ils semblent inutiles à l'ouverture des liaisons glucosidiques (FROMAGEOT, 45).

En résumé nos connaissances sur le lysozyme sont à l'heure actuelle assez précises. Du point de vue chimique il s'agit d'une protéine pure, obtenue à l'état cristallisé. Ses teneurs en azote, soufre, acides aminés, constituent des documents bien établis. Le poids moléculaire est connu avec une approximation satisfaisante ainsi que diverses propriétés physiques telles que le point iso-électrique, le comportement électrophorétique et la solubilité dans des conditions diverses.

Au point de vue de l'enzymologie le lysozyme doit être considéré comme un catalyseur capable de libérer certains polyholosides colloïdaux microbiens de leur copule protéidique, d'assurer leur dépolymérisation et peut-être, de leur faire subir une légère hydrolyse. Cette action enzymatique a fait l'objet d'études permettant de préciser sa température optima, son pH optimum et certains de ses effecteurs. Par contre, les données relatives à l'étude des produits libérés au cours de cette action enzymatique n'ont fait l'objet que de recherches très sommaires.

Comme nous le verrons, le but essentiel de notre travail sera d'étudier les substances de nature glucidique libérées à la suite de l'action du lysozyme sur *Hemophilus pertusis*. Nous pensons donc qu'il est utile d'introduire ici une étude sommaire sur les polyholosides microbiens et de rappeler les caractères biologiques principaux du bacille de BORDET et GENGOU.

B. - POLYOSIDES MICROBIENS ET H. PERTUSIS

Les bactériologistes se sont penchés depuis de nombreuses années sur l'étude de la structure antigénique des micro-organismes. L'importance des composés somatiques protéiques nucléoprotéiques, lipidiques, pour la virulence des germes, ne doit laisser oublier le rôle primordial des polysaccharides et leur importance en immunologie.

Les polysaccharides microbiens sont soit intracellulaires, capsulaires ou même flagellaires.

L'étude des polysaccharides purifiés, isolés des diverses variétés de micro-organismes, en particulier du pneumococque laisse penser que ces substances ont la propriété d'haptène. De nombreuses observations SCHIEMANN et CASPER (87), SCHIEMANN (86), FRANCIS et TILLET (38), FINLAUD et SUTLIFF (33), ZOZAYA et CLARK (108) avaient été faites, elles étaient difficiles à concilier avec ce point de vue.

Les études d'AVERY et GOEBEL (7) jetèrent une lumière nouvelle sur cette question. Ils montrèrent que, dans la capsule bactérienne "hydrate de carbone du pneumococque est acétylé. Ces groupements acétyls étant séparés lors de la préparation, ce simple changement dans la structure du corps entraîna la disparition de son pouvoir antigénique.

Des résultats analogues ont été trouvés par d'autres auteurs sur d'autres bactéries. WONG et TUNG (107), WONG (106) étudient le bacille diphtérique et le *B. rhinoscléromatis*. MORGAN et PARTRIDGE (73), FREEMAN (44) sur le *B. Shiga*, le *B. d'Eberth*, le *Typhi murium* soulignent l'importance de la technique d'extraction dans l'isolement du polysaccharide.

La technique doit, en effet, être suffisamment énergique pour libérer toutes les fractions polysaccharidiques des cénapses glucido-lipidiques, nucléiques, protidiques, dans lesquelles elles sont impliquées, et d'autre part suffisamment douce pour ne pas toucher à l'intégrité de la macromolécule. Il faut aussi pouvoir modifier la structure de la membrane cellulaire pour permettre la diffusion des produits intracellulaires vers l'extérieur.

Considérons maintenant le cas particulier de l'*Hemophilus pertusis* (Holland) ou bacille de BORDET et GENGOU.

Ce micro-organisme a été découvert en 1906 par ces auteurs, dans les expectorations des coquelucheux où il se trouve au début de la maladie à l'état de pureté. Il se présente sous la forme de petits bâtonnets de 1μ à 2μ de long sur $1/3\mu$ de large. Il peut cependant prendre une forme allongée et se grouper en petits paquets. Il fixe les colorants usuels et prend la coloration bipolaire. Il ne garde pas la coloration de Gram.

Il demande une aérobose stricte et doit être isolé sur des milieux spéciaux en présence de sang. Il s'adapte lentement à la culture sur gélose ordinaire. Au fur et à mesure des repiquages il passe de la forme S à la forme R. Les microbes adaptés sont avirulents. Ils se caractérisent macroscopiquement par une abondance de glaires mucilagineuses.

Le broyage des microbes, les ultra-sons, les congélations et décongélations successives permettent la libération de produits endomicrobiens. Les corps ainsi préparés ont été étudiés. Ils peuvent être classés en : protéines et toxines, nucléoprotéines, polysaccharides.

L'endotoxine brute a été mise en évidence pour la première fois par BORDET et GENGOU en 1908. Elle fut décomposée en plusieurs facteurs. EVANS et MAITLAND (31) en 1937 ont mis en évidence :

- une toxine thermolabile provoquant les hémorragies, escarhes et nécrose lors des injections intradermiques des germes. Elle peut être transformée par le formol en anatoxine, elle provoque l'apparition d'un sérum antitoxique agissant « in vitro » et non « in vivo » ;
- un agglutinogène thermostable fortement antigénique, donnant naissance « in vivo » chez le lapin à un anticorps mais mettant cet animal en état allergique ;

- FLOSDORF et Col. (35) (37) mirent en évidence une toxine thermostable faiblement toxique ne semblant jouer qu'un rôle secondaire ;
- enfin une hémagglutinine thermolabile a été mise en évidence en 1948 par TOURNIER (99) en France, et KEOGH, NORTH et WARBURTON aux U.S.A.

Les acides nucléiques du bacille de BORDET et GENGOU ont été étudiés par WEBB (102) qui les extrait par chauffage des microbes en présence de cholate de sodium, et par OVEREND, STACEY, WEBB, UNGAR (76). Ces auteurs utilisent soit une technique dérivée de celle de WEBB, soit le broyage mécanique ; ils isolent ainsi les acides desoxy-ribonucléiques des souches virulentes et avirulentes. Ces auteurs mettent l'accent sur la quantité considérable de polysaccharide liée aux acides nucléiques.

L'importance des polysaccharides dans la composition chimique de *H. pertusis* avait été soulignée par les travaux de différents auteurs. La forme S, capsulée contient du polysaccharide (LAWSON, 66). Cette substance peut être extraite par simple agitation (MILLER, 72). FLOSDORF, KIMBALL et CHAMBERS (36). FLOSDORF et KIMBALL (35) l'extraient par les ultra-sons. CRUICKSHANK et FREEMAN (22) par digestion trypsique obtiennent un hydrate de carbone, soluble dans l'eau immunisant pour la souris. SMOLENS et MUDD (92) extraient par acidification une grande quantité de substance dont une fraction peut être assimilée à la toxine thermostable isolée par FLOSDORF.

Aucun auteur n'a précisé la constitution chimique d'une des substances glucidiques considérées.

OBJET DU TRAVAIL

Nous avons rappelé brièvement au cours de notre introduction les principales propriétés chimiques et biologiques du lysozyme. Nous avons conclu que cet enzyme agissait sur les muco-poly-saccharides constituant la membrane cellulaire permettant ainsi la diffusion des constituants protoplasmiques vers l'extérieur. Parmi ces constituants les polyholosides peuvent être à leur tour dépolymérisés et même hydrolysés par le lysozyme.

Nous avons, d'autre part, souligné l'importance des polysaccharides microbiens et la difficulté de les isoler. Aussi avons-nous pensé qu'une action ménagée du lysozyme pourrait apporter une solution avantageuse aux problèmes de l'isolement de ces polyoses. L'hydrolyse enzymatique des liaisons hétéro-glucidiques permettrait de purifier les sucres en détruisant la plupart des cénapses glucido-protéiques et glucido-nucléiques dans lesquels ils sont impliqués. (SHOLENS et MUDD, 92), OVEREND, STACEY, WEBB, UNGAR (76).

Le bacille de BORDET et GENGOU nous a paru un des micro-organismes les plus intéressants pour la vérification de notre hypothèse. En effet, il est riche en substances mucoides et apparaît comme un matériel de choix. ROMANA (85) traitant la coqueluche au moyen d'hélicidine (produit obtenu à partir des glandes salivaires d'*Helix pomatia*) rend responsable de cette action thérapeutique une substance contenue dans la préparation et qui serait analogue au lysozyme. Cette action fut confirmée « in vitro » par MAINIL (69) qui montre un pouvoir bactériostatique, puis mucolytique de l'hélicidine.

Nos recherches personnelles portent essentiellement sur les points suivants :

- 1° Etude de l'action du lysozyme sur le bacille de BORDET et GENGOU (*H. pertusis*) ;
- 2° Isolement de la substance de nature glucidique dont la mise en évidence a résulté des recherches précédentes ;
- 3° Etude des propriétés et de la constitution chimique du produit ainsi isolé ;
- 4° Etude de ses propriétés immunologiques.

I. - ACTION DU LYSOZYME SUR *H. PERTUSIS*

Il a été nécessaire pour notre expérimentation de cultiver en abondance de *Hemophilus pertusis* et de préparer du lysozyme cristallisé.

a) Préparation des suspensions microbiennes

Monsieur le professeur VIOLIE préconise la technique suivante : la souche d'*H. pertusis* que nous avons utilisée est avirulente ; elle a été cultivée sur gélose nutritive ordinaire. Les cultures ont été faites dans des boîtes de Roux d'un litre de capacité. Après l'ensemencement ces boîtes ont été placées sept jours à l'étuve à 36°. On observe au cours du développement des microbes l'apparition de glaires abondantes et mucilagineuses qui s'étendent et se développent de plus en plus. Ce temps écoulé les germes et la substance muqueuse qu'ils provoquent sont recueillis, lavés avec de l'eau physiologique pour les débarrasser des impuretés dues au bouillon qui auraient pu être entraînées. Les suspensions sont utilisées dans les 24 heures qui suivent leur préparation.

b) Préparation du lysozyme cristallisé

Le lysozyme a été préparé selon la technique décrite par ALDERTON - FELVOLD (2).

« Du blanc d'œuf débarrassé des chalazes est homogénéisé et additionné de solution de soude jusqu'à pH = 9.5 ainsi que de 5 p. 100 de chlorure de sodium. Ensemencé avec quelques cristaux de lysozyme, puis maintenu à la température de 4° le milieu montre 4 à 5 jours après une grande quantité de fines aiguilles. Le produit ainsi cristallisé est redissout dans une solution diluée d'acide acétique (pH = 4 à 6) : on élimine tout le matériel insoluble par centrifugation, et on recristallise soit par addition de 5 p. 100 de chlorure de sodium à pH = 9.5 — 10.0, soit en ajoutant à la solution une 5 p. 100 de bicarbonate de sodium (pH = 9.0 — 8.5). Cette opération répétée à cinq ou six reprises fournit

un lysozyme cristallisé pur, soit sous forme de chlorhydrate soit sous forme de carbonate. »

Nous avons opéré de la façon suivante : nous avons filtré les blancs d'œufs sur une gaze déposée sur un buchner et en nous aidant d'une légère aspiration de la trompe à vide ce qui les débarrasse des chalazes et les homogénéise. Nous avons mélangé, sous agitation mécanique 250 cm³ d'une solution à 25 p. 100 de chlorure de sodium, à un litre de blanc d'œuf.

Etant donné l'assez faible rendement de l'opération, après une première élimination des cristaux formés, nous avons replacé la liqueur à la glacière ; une deuxième cristallisation a lieu qui permet d'obtenir une protéine aussi active et aussi pure que la première cristallisation.

Le lysozyme cristallisé sous forme de son carbonate peut être redissout dans de l'eau légèrement acidifiée (pH = 5) par de l'acide acétique. La solution conserve son activité pendant plusieurs mois à la glacière

— le carbonate de lysozyme peut aussi être lyophilisé — la poudre obtenue se conserve alors indéfiniment en tube scellé.

c) Détermination de la concentration des solutions de lysozyme

Dans la plupart des cas il est bon de contrôler la concentration des solutions de lysozyme. La teneur particulièrement élevée de la protéine en tryptophane (10,6 p. 100) permet un dosage assez sélectif. Nous avons utilisé pour le dosage du tryptophane dans la protéine la technique décrite par L. CARAVEL (16). Cette méthode est fondée sur un principe qui s'apparente à la réaction d'ADAM KIEWICZ. Elle consiste à mesurer l'adsorption lumineuse de la coloration qui prend naissance à la suite de la réaction des composés de dégradation alcaline du chloral sur le tryptophane, en milieu sulfurique au bain-marie bouillant. La méthode n'exige aucune hydrolyse préalable des protéines solubles dans l'eau. Elle se recommande par sa sensibilité, sa spécificité et sa précision (+/- 2 p. 100) la marge d'utilisation s'étend de 0,050 gr. à 0,250 gr. de tryptophane dans la prise d'essai.

Par ailleurs dans le but de vérifier le degré de pureté de nos échantillons de lysozyme nous avons également dosé l'azote (microkjeldahl), le soufre (méthode TOURATIER, 98), après minéralisation par le chlorate de potassium, l'arginine (méthode de DUMAZERT et POGGI, 26).

Voici, à titre d'exemple, les résultats obtenus sur l'une de nos préparations.

Tableau 1

Comparaison (en gr. p. 100) de quelques éléments dosés dans le lysozyme

<i>Éléments dosés</i>	Trouvé	Selon FRAENKEL-CONRAT
Azote	18,6	18,6
Soufre	2,42	2,53
Tryptophane	10,5	10,6
Arginine	12,4	12,7

De l'examen de ce tableau, il ressort que nos préparations présentent des teneurs en azote, soufre, tryptophane et arginine en bon accord avec les données classiques. Nous pouvons donc affirmer que nous disposons de lysozyme pur.

Telles sont les techniques qui nous ont permis de préparer les suspensions de micro-organismes et les solutions de lysozyme nécessaires aux recherches que nous avons entreprises.

Nous devons maintenant faire quelques remarques sur la structure des suspensions d'*H. pertusis*. La souche que nous avons utilisée pour les préparer n'est pas une souche pathogène. Elle est adaptée à la culture sur bouillon nutritif gélifié. Elle se caractérise par la présence de glaires abondantes secrétées par les micro-organismes. Ces substances mucoïdes entourent les bacilles et constituent une véritable sécrétion de nature essentiellement poly-osidique. Elles sont facilement isolables par des procédés simples (72-92). — et permettent d'obtenir un composé glucidique abondant. Il n'en est pas de même des polyosides entrant dans la constitution du corps microbien lui-même. Il est évident que leur isolement implique la destruction de la cellule par des procédés plus complexes tels que l'action des ultra-sons ou les congélations et décongélations successives (35).

En résumé, nous devons distinguer deux groupes de polyosides. Le premier tire son origine des mucoïdes externes et représente une quantité importante de substances glucidiques en raison de la masse prépondérante des mucoïdes sur celle des bacilles. Le second a pour origine le corps microbien lui-même et de ce fait ne peut exister qu'en quantité très inférieure à celle du premier.

Etant donné que les polysides du premier groupe sont très facilement isolables, il apparaît que toute tentative d'isolement de ceux du second conduit en premier lieu à un mélange de la totalité des substances glucidiques.

Par conséquent, l'efficacité des procédés mis en œuvre pour extraire les polyoses cellulaires ne pourra être contrôlée que par une augmentation notable du poids des polysides totaux provenant de l'extraction. Cela implique la connaissance précise de la quantité de substances glucidiques d'origine extra-cellulaire. C'est pourquoi, au cours de tous nos essais nous avons comparé les quantités de glucides extraites directement avec celles extraites consécutivement à l'action du lysozyme et à partir de quantités équivalentes d'une même suspension microbienne.

Nous allons maintenant décrire les expériences que nous avons réalisées.

En premier lieu, nous avons mis en évidence l'action du lysozyme sur les suspensions d'*H. pertusis*. Deuxièmement, nous avons constaté la présence, dans le milieu réactionnel, de produits protoplasmiques colloïdaux. Troisièmement, nous avons caractérisé la nature glucidique de ces produits. Quatrièmement nous avons étudié l'action du pH sur l'activité enzymatique du lysozyme.

1° Etude de l'action du Lysozyme sur une suspension d'*H. Pertusis*.

a) *H. pertusis* se colore facilement par le bleu de méthylène. Cependant, on constate que des germes chauffés une heure à 37°C en présence d'une solution de lysozyme ne se colorent plus ;

b) Nous avons fait agir des quantités variables de lysozyme sur une suspension déterminée d'*H. pertusis* selon le mode opératoire suivant :

— dans une série de tubes à essais jaugés à 6 cm³, nous avons mesuré un volume de suspension microbienne contenant 6 milliards de germes. Nous avons ajouté des quantités croissantes de lysozyme (O - témoin - 6,5 mg) et complété aux traits de jauge par de l'eau physiologique après avoir vérifié le pH du milieu (5.6 - 5.7). Nous avons mesuré la densité optique⁽¹⁾ des tubes et les avons portés à 50°C. Les mesures des densités optiques réalisées au bout d'une heure trente et deux heures ont donné les résultats consignés dans le tableau n° II.

(1) Les résultats sont exprimés en densité optique au facteur de correction près dépendant de l'appareil que nous avons utilisé.

Tableau II

Variation de la densité optique ($^{\circ}$) d'une suspension d'*H. pertusis* en fonction du temps et de la concentration en lysozyme.

QUANTITÉ DE LYSOZYME (en mgr.)	DENSITÉ OPTIQUE AUX TEMPS		
	0	1 h. 30	2 h.
0	0,77	0,74	0,75
0,65	»	0,76	0,76
1,30	»	0,77	0,79
3,25	»	0,80	0,79
4,88	»	0,79	0,81
6,50	»	0,83	0,82

De l'examen de ce tableau, il ressort que la densité optique augmente en présence de lysozyme et cette augmentation est proportionnelle aux quantités d'enzyme mises en œuvre.

c) une suspension d'*H. pertusis* ayant subi l'action du lysozyme est éclaircie par addition d'un cm^3 de solution N de soude. L'addition d'une même quantité d'alcali à une suspension témoin (c'est-à-dire en absence de lysozyme) provoque une floculation et non la dissolution constatée précédemment.

Les résultats de ces expériences peuvent se résumer ainsi : les germes mis au contact du lysozyme ne se colorent plus par le bleu de méthylène, la densité optique de leur suspension est augmentée. Enfin, l'addition ultérieure d'alcali provoque la dissolution totale des germes dans le milieu.

Ces faits traduisent des modifications biologiques d'*H. pertusis* et peuvent s'expliquer par l'action du lysozyme sur la membrane et le protoplasme cellulaire. Les résultats de ces premières expériences nous ont montré l'action du lysozyme sur *H. pertusis*. Nous allons maintenant justifier le point de vue que nous avons déjà exposé : le lysozyme est capable de libérer des polyholosides du corps microbien lui-même.

2° MISE EN EVIDENCE D'UNE SUBSTANCE LIBÉREE PAR ACTION DU LYSOZYME :

Nous avons fait agir sur *H. pertusis*, dans les conditions décrites précédemment, des quantités croissantes de lysozyme (O (témoin) à 33,75 mgr). Nous avons déféqué le milieu par addition d'un égal volume (soit 6 cm^3) de solution à 20 p. 100 d'acide trichloracétique et centrifugé

pendant 2 à 3 minutes à 3.500 tours/minute. Nous avons constaté que la liqueur surnageante est trouble et détermine sa densité optique. Les résultats de ces mesures sont rassemblés dans le tableau III.

Tableau III

Variation de la densité optique du filtrat trichloracétique en fonction de la concentration du lysozyme.

LYSOZYME (en mgr.)	DENSITÉ OPTIQUE	($\Delta x - \Delta o$) 10 (1)
0	0,62	—
0,65	0,64	2
1,30	0,72	10
3,25	0,81	19
4,88	0,86	24
6,50	0,89	27
9,75	0,88	26
0	0,58	—
0,30	0,60	2
0,75	0,61	3
1,00	0,62	4
1,50	0,69	11
3,00	0,72	14
0	0,58	—
2,25	0,72	14
3,38	0,80	22
4,50	0,83	25
9,0	0,86	28
11,25	0,84	26
22,5	0,46	— 12
33,75	0,36	— 22

De l'examen de ce tableau, il ressort que dans les conditions où nous nous sommes placés le lysozyme agit sur *H. pertusis* en libérant une substance de nature colloïdale soluble en milieu trichloracétique. En effet, en l'absence de lysozyme les filtrats de déprotéinisation par l'acide trichloracétique ne présentent qu'un trouble léger dont l'adsorption lumineuse répond aux valeurs Δo . Par contre, en présence de lysozyme, les filtrats de déprotéinisation présentent un trouble dont l'absorption lumineuse x croît parallèlement à la concentration du milieu en enzyme (voir tableau III). Il y a lieu de noter que, lorsque les quantités de lysozyme deviennent très importantes, on assiste à une très nette clarification du milieu.

En résumé, cette expérience montre que l'enzyme agit sur *H. pertusis* en libérant une substance de nature colloïdale, soluble dans une solution à 10 p. 100 d'acide trichloracétique, dont la présence se manifeste par

(1) $x - o$ = différence entre les densités optiques des essais Δx et celles des témoins Δo .

l'importance du trouble des filtrats de déprotéinisation. Un excès de lysozyme paraît conduire à une dépolymérisation de ce corps se traduisant par la clarification des filtrats. Nous avons recherché, alors, quelle est la nature chimique de cette substance.

3° NATURE CHIMIQUE DU CORPS SOLUBLE DANS L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE :

Nous avons vu qu'il était possible d'admettre la nature glucidique de la plupart des substances libérées par action du lysozyme. Nous avons réalisé l'expérience suivante dans le but de vérifier la nature glucidique des substances colloïdales que nous avons mises en évidence.

Nous avons ajouté à des filtrats trichloracétiques un excès d'alcool à 95° (soit 60 cm³ pour 12 cm³) et laissé une nuit à la glacière. Une substance insoluble dans l'alcool fort précipite. Elle est recueillie par centrifugation par de l'alcool à 95°. Nous avons hydrolysé ces culots au moyen de 3 cm³ de solution 2N d'acide sulfurique à 120° (autoclave) pendant une heure. Après neutralisation des hydrolysats nous avons dosé leur pouvoir réducteur par la technique de LEWIS et BENEDICT (65) (1).

Quelques-uns des résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV

Tableau IV

Pouvoir réducteur après hydrolyse (exprimé en mgr. de glucose)
en fonction de la quantité d'enzyme ayant agi
et de la densité optique du filtrat trichloracétique

LYSOZYME (en mgr))	DENSITÉ OPTIQUE	POUVOIR RÉDUCTEUR (mgr. de glucose) après hydrolyse
0	0,58	0,80
0,25	0,60	0,83
1,00	0,65	0,90
2,50	0,70	0,92
3,40	0,83	1,05

(1) Méthode colorimétrique basée sur la réduction en milieu alcalin de l'acide picrique (jaune) en acide picramique (orangé), la déprotéinisation du milieu est assurée par le réactif picrique.

De l'examen de ce tableau ressortent les faits suivants. En l'absence de lysozyme les suspensions d'*H. pertusis* déprotéinisées par l'acide trichloracétique contiennent une certaine proportion de substances répondant aux caractères des polyosides colloïdaux. En effet, celles-ci sont précipitables par l'alcool fort et soumises à l'hydrolyse chimique conduisent à la libération de produits réducteurs dosables à l'égal des oses. Pour une suspension correspondant à la présence de six milliards de germes environ nous avons pu estimer à 0,80 mgr la quantité de substances glucidiques (exprimé en glucose) (Voir première ligne du tableau IV).

Par ailleurs, on constate que le contact des germes avec des quantités croissantes de lysozyme entraîne l'apparition de substances de nature analogue mais en quantités nettement plus élevées (soit jusqu'à 1.05 mg au lieu de 0,80 mg).

En résumé, compte tenu de ce que nous avons déjà exposé, l'action de l'acide trichloracétique permet d'isoler un produit de nature polyosidique qui peut être assimilé aux constituants mucoïdes d'*H. pertusis*. Il est important de souligner que l'action du lysozyme contribue à la libération dans le milieu d'un excès de substance de nature glucidique à partir des suspensions d'*H. pertusis* ; il est légitime d'assimiler cet excès aux substances de nature osidique endocellulaires.

4° INFLUENCE DU pH SUR LA LIBERATION D'UNE SUBSTANCE DE NATURE GLUCIDIQUE EN PRÉSENCE ET EN L'ABSENCE DE LYSOZYME :

L'expérience précédente nous a montré qu'il y avait accord entre la quantité de substances libérée (pouvoir réducteur) et la densité optique, de la solution trichloracétique. Il nous a paru intéressant d'appliquer la mesure de la densité optique de la solution trichloracétique à l'étude de l'influence du pH sur la libération de la substance de nature glucidique en l'absence et en présence du lysozyme.

Nous avons réalisé l'expérience suivante : dans deux séries de tubes à essais jaugés à 6 cm³ nous avons mesuré un volume de suspension microbienne contenant 6 milliards de germes. Nous avons ajouté dans une série une certaine quantité de lysozyme 1,15 mgr, l'autre série servant de témoin. Nous avons complété aux traits de jauge par de l'eau physio-

logique après avoir ajouté dans chaque tube 1 cm³ de solution tampon, préparée d'après SORENSEN (1), de manière à ce que les tubes aient des pH différents. Les pH sont vérifiés au début et à la fin de l'expérience et ne varient pas de $\pm 0,10$ unité pH — les tubes sont chauffés une heure trente à 50°C.

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux V et VI.

Tableau V

Densité optique des solutions trichloracétiques
obtenues en l'absence de lysozyme

pH	DENSITÉ OPTIQUE
3,9	0,11
4,6	0,36
5,0	0,43
5,6	0,48
6,2	0,52
6,3	0,49
6,7	0,49
7,1	0,48
7,2	0,52

Tableau VI

Densité optique des solutions trichloracétiques
obtenues en présence de lysozyme

pH	DENSITÉ OPTIQUE
4,0	0,60
4,6	0,64
5,2	0,64
5,8	0,65
6,1	0,67
7,0	0,61
7,3	0,60

L'examen de ces tableaux montre que les pH les plus favorables à la libération de la substance glucidique en l'absence de lysozyme se situent non pas dans une zone acide mais au contraire voisine de la neu-

(1) Les solutions tampon que nous avons utilisées sont :

— solution 1/5 Molaire acéto-acétique pour le pH allant de 3,3 à 5,7 ;
— solution 1/15 Molaire phosphate mono potassique, phosphate disodique pour les pH allant de 5,7 à 7,5.

tralité. Il en est de même pour la libération des substances osidiques sous l'action du lysozyme. Les pH favorisant le mieux le pouvoir enzymatique sont voisins de pH 6. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par BOASSON (10), THOMPSON (96).

Ce travail préliminaire nous a permis de montrer l'action du lysozyme sur le bacille de BORDET et GENGOU. Cette action se traduit par des modifications de certaines propriétés biologiques des germes et par la libération aux dépens d'*H. pertusis* d'une substance colloïdale de nature glucidique.

Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés nous avons constaté que la quantité de substance libérée était proportionnelle à la quantité d'enzyme mise en jeu.

Nous avons pu préciser également le pH le plus favorable à l'action de l'enzyme, lorsque cette action se traduit par la libération d'une substance de nature glucidique.

IV. - ETUDE DE L'ACTIVITE IMMUNOLOGIQUE DE LA SUBSTANCE GLUCIDO-PROTIDIQUE

Nous avons signalé au cours de notre introduction que les substances glucidiques extraites d'*H. pertusis*, possèdent une activité immunologique. Elle se traduit par l'apparition d'agglutinines, dans le sérum des animaux auxquels elles ont été injectées. Ces agglutinines sont capables d'agglutiner les germes d'une suspension d'*H. pertusis*.

Nous nous sommes demandés si la substance que nous avons isolée possédait une activité analogue. Pour cela nous avons réalisé les expériences suivantes :

1° Nous avons injecté une solution de notre produit à des lapins et nous avons recherché au bout d'un certain temps si le sérum des animaux ainsi traités était susceptible d'agglutiner une suspension d'*H. pertusis*.

2° Nous avons injecté une solution identique à des souris. Nous avons recherché si cette injection était capable de les prémunir contre l'inoculation massive et sûrement mortelle d'*H. pertusis*.

3° Ces expériences nous ont conduits à rechercher si le sérum de lapin anti-*H. pertusis* que nous avons préparé était capable de protéger les souris inoculées.

Avant d'entreprendre la relation des expériences que nous avons réalisées nous allons exposer la méthode utilisée pour la recherche du pouvoir agglutinant du sérum : on met en contact une goutte d'émulsion microbienne (800 millions de germes par cm³ environ) et des quantités variables de sérum de telle manière que la concentration finale du sérum dans le volume total des différents essais (20 gouttes) soit de 1/10^e, 1/100^e, 1/1.000^e, 1/10.000^e, on chauffe trente minutes au bain-marie à 45°, puis on laisse séjourner une nuit à la température du laboratoire ou même dans un endroit frais. Le lendemain matin on observe la dilution maxima du sérum qui a déterminé la formation d'agglutinats bacillaires.

1° FORMATION D'ANTICORPS PAR INJECTIONS DU POLYOSIDE EXTRAIT D'H. PERTUSIS.

Nous allons décrire les expériences relatives aux injections de la substance par voie intraveineuse et par voie sous-hypodermique. Nous exposerons également celles relatives à l'absorption du produit par instillations nasales.

a) Injections intraveineuses :

Les lapins soumis à ces expériences pèsent environ 2 kg. 500. On leur injecte 2 mg par kg. du polyoside mis en suspension dans de l'eau physiologique neutre (expériences 1 et 2) ou dans de l'eau physiologique légèrement alcalinisée (expérience 3°) dans le but d'obtenir une meilleure dissolution de la substance. Les injections sont répétées tous les sept jours. On détermine le pouvoir agglutinant du sérum des animaux chaque semaine.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° IX.

TABLEAU IX

Pouvoir agglutinant du sérum de lapins.

Les animaux étant soumis à des injections intraveineuses (2 mg/kg.) de la substance de nature glucidique extraite d'*H. pertusis*.

Exp. N°	Injection N°	Dilution du sérum			
		1/10°	1/100°	1/1.000°	1/10.000°
1	1	+			
	2	+	+		
	3	+	+	+	
2	1	+	+		
	2	+	+		
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
3	1	+	+		
	2	+	+		
	3	+	+		
	4	+			

De l'examen de ce tableau il ressort que le produit que nous avons isolé est capable, lorsqu'il est injecté par voie intra-veineuse à des lapins,

de provoquer l'apparition d'agglutinines dans le sérum de ces animaux. La répétition des injections provoque l'augmentation du pouvoir agglutinant. C'est ainsi que l'on a pu obtenir, après quatre injections de la substance, des sérums dont le taux d'agglutination peut atteindre le 1/10.000^e. La dissolution du produit en milieu alcalin entraîne une diminution de son activité immunologique, le taux d'agglutination ne dépassant pas le 1/100^e après une même série d'injections.

b) Injections sous hypodermiques :

Nous avons réalisé la même expérience que précédemment en substituant la voie sous-hypodermique à la voie intraveineuse.

Les résultats et les doses injectées (en mg par kg) sont consignés dans le tableau X.

TABLEAU X

Détermination du pouvoir agglutinant du sérum de lapin. Les animaux étant soumis à des injections sous-hypodermiques de la substance de nature glucidique extraite d'*H. pertusis*.

Exp. N ^o	Inject. N ^o	Doses injectées	Dilution du sérum			
			1/10 ^e	1/100 ^e	1/1.000 ^e	1/10.000 ^e
1	1	4 mg/Kg	+	+		
	2	4 mg/Kg	+	+	+	
	1	4 mg/Kg	+	+		
	2	2 mg/Kg	+	+	+	+

De l'examen de ce tableau il ressort que le produit est capable de provoquer l'apparition d'un pouvoir agglutinant dans le sérum des animaux lorsqu'il est injecté par voie sous-hypodermique, le taux d'agglutination du sérum pouvant atteindre au bout de deux injections le 1/10.000^e.

c) Instillations nasales :

Les lapins sont de même poids que les précédents : l'administration est réalisée en faisant tomber goutte à goutte une solution du polyoside dans les fosses nasales des animaux. Les instillations sont répétées tous

les sept jours. On détermine sept jours après chaque instillation le pouvoir agglutinant du sérum des animaux.

Les doses utilisées (mgr par kg) et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Détermination du pouvoir agglutinant du sérum des lapins. Les animaux absorbant par instillations nasales du polyoside extrait d'*H. pertusis*.

Exp. N°	Instil. N°	Dose instil.	Dilution du sérum			
			1/10°	1/100°	1/1.000°	1/10.000°
1	1	1 mg/Kg	+			
	2	2 mg/Kg	+	+		
	3	2 mg/Kg	+	+		
	4	2 mg/Kg	+	+	+	
2	1	2 mg/Kg				
	2	2 mg/Kg				
	3	2 mg/Kg	+	+		
	4	2 mg/Kg	+	+		

De l'examen de ces résultats, il ressort que le produit est encore actif au point de vue immunologique, lorsqu'il est absorbé par voie nasale. Malgré le petit nombre d'expériences réalisées il est évident que l'activité du produit est plus faible par cette voie que lorsqu'il est injecté. Le taux maximum d'agglutination ne dépasse pas le 1/1.000°.

En résumé les expériences précédentes montrent que le produit de nature protido-glucidique que nous avons isolé est actif au point de vue immunologie. Cette activité se manifeste lorsque le produit est injecté par voie intraveineuse, par voie sous-hypodermique, et même lorsqu'il est absorbé par instillations nasales. L'activité se traduit par l'apparition d'un pouvoir agglutinant du sérum des animaux traités.

Le pouvoir agglutinant est généralement augmenté par la répétition des injections et des instillations.

La voie la plus favorable pour l'utilisation de ce produit est la voie intraveineuse.

Nous noterons ici que les injections de solution du produit ne provoquent aucun phénomène de choc. Aucune lésion de la peau n'apparaît au point d'injection. Ces lésions sont fréquentes lors des injections de suspension d'*H. pertusis*, celles-ci apportant une substance nécrosante.

2° ESSAIS DE VACCINATION A L'AIDE DU POLY-OSIDE EXTRAIT D'H. PERTUSIS.

Les expériences précédentes ont montré que le produit isolé d'*H. pertusis* possédait une activité immunologique. Ce produit est susceptible de provoquer l'apparition d'anticorps spécifiques dans le sérum des animaux auxquels il est injecté. Nous avons recherché si les anticorps ainsi formés pouvaient prémunir les animaux lors d'une attaque massive des germes.

Nous avons réalisé l'expérience suivante :

1° On détermine pour un lot homogène de souris le volume de suspension d'*H. pertusis* qui, injecté intrapéritonéalement, est capable de provoquer en trois jours la mort des animaux. Environ 800 millions de germes sont nécessaires.

2° On sépare 12 souris du même lot. A 6 d'entre elles (essais) on injecte 5 mg de substance protido-glucidique par animal. Des injections identiques sont réalisées le 7^e et le 14^e jour. Une semaine après la dernière injection on inocule à ces souris la quantité de microbes précédemment déterminée, de même aux 6 autres animaux qui serviront de témoins

Les résultats sont les suivants :

TÉMOINS : Toutes les souris meurent dans les 3 jours suivant l'inoculation.
ESSAIS : Deux souris meurent dans les 7 jours, les quatre autres survivent.

Ces résultats montrent que les injections répétées de substance glucido-protidique sont capables de protéger les animaux. Ceci s'explique par la présence d'anticorps spécifiques dans leur sérum. La substance est donc capable de réaliser une véritable vaccination.

3° POUVOIR ANTI-MICROBIEN DU SERUM DES ANIMAUX IMMUNISES.

Nous venons de voir que le produit glucidique est capable de réaliser une véritable vaccination. Ceci nous a conduits à rechercher si le sérum des animaux ainsi immunisés possédait une action curative. Nous avons opéré de la manière suivante :

a) Préparation du sérum :

L'animal utilisé est le lapin. On injecte à des animaux pesant environ 2,500 kgs, 8 mg par kg. de la substance de nature glucidique, en 4 injections intraveineuses (une tous les 7 jours) le sérum utilisé possède un taux d'agglutination qui doit atteindre le 1/10.000^e.

b) Détermination de la dose léthale de germes :

On recherche comme précédemment le nombre de micro-organismes qui inoculé à une souris est juste nécessaire pour la tuer en 3 jours.

c) Expériences :

On injecte à 12 souris (voie intrapéritonéale) la suspension microbienne précédemment déterminée.

— Six animaux, 6 heures après l'inoculation reçoivent 1 cm³ de sérum de lapin (voie intra-péritonéale) ;

— Les six autres souris servent de témoins.

On observe la mortalité dans les deux lots. Les résultats sont groupés dans le tableau XII.

TABLEAU XII

Mortalité des souris ayant reçu une dose léthale d'*H. pertusis* (témoin)
et celle des souris ayant en outre reçu du sérum de lapin (essais)

	Nombre de souris mourant le				Nombre de souris vivant le 8 ^e jour
	1 ^{er} jour	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour	
Témoin	2	3	1	0	0
Essai	0	1	1	0	4

L'examen de ce tableau montre que le sérum de lapin préparé par injections répétées de substance glucidique est capable de protéger les souris contre une attaque massive des germes. Ce sérum peut être assimilé aux sérums thérapeutiques.

EXAMEN DES RESULTATS ET CONCLUSION

Arrivé au terme de nos recherches il convient de discuter les résultats de notre travail et d'en tirer les conclusions. Dans notre introduction nous nous sommes efforcés de présenter une mise au point relative aux données acquises sur le lysozyme. Cet enzyme particulier présente le très grand avantage de pouvoir être obtenu facilement sous la forme d'une protéine cristallisée.

Nous avons vu que son action consiste essentiellement à libérer les polyholosides colloïdaux des combinaisons qu'ils peuvent contracter avec d'autres constituants cellulaires. Elle se poursuit le plus souvent par une dépolymérisation des polyosides ce qui facilite leur diffusion vers le milieu extérieur. La libération d'oses réducteurs par hydrolyse de certaines liaisons osidiques est par contre assez controversée.

Le lysozyme nous est donc apparu comme un agent susceptible de libérer certains constituants glucidiques microbiens et de ce fait capable de faciliter leur isolement. Dans notre travail le lysozyme nous a servi à mettre au point une technique d'isolement des polyosides colloïdaux du bacille de BORDET et GENGOU. Nos recherches se sont poursuivies par l'étude de la constitution chimique de ces substances glucidiques isolées après l'action de l'enzyme sur les cultures d'*H. pertusis*. Par la suite nos recherches devaient déborder le cadre de cette étude purement biochimique pour s'intéresser à la mise en évidence des propriétés immunologiques de la substance isolée dont on devait espérer qu'elle se comporterait comme un haptène, à l'égal par exemple des polyosides des pneumocoques.

A la suite des premières expériences d'orientation nous avons montré que l'action du lysozyme permet d'augmenter le rendement en substances de nature poly-osidique lorsque celles-ci sont isolées par une technique que nous avons décrite et dont nous rappellerons ci-dessous les principaux détails :

— Le produit des cultures d'*H. pertusis* est soumis à l'action du lysozyme à pH = 5.8 à la température de 50°C, pendant une heure et demie. Au bout de ce temps le milieu est déprotéinisé par addition d'acide trichloracétique. Le filtrat se présente sous l'aspect d'une solution colloïdale. Un excès d'alcool fort ajouté à cette liqueur provoque la formation d'un précipité blanc que l'on isole et que l'on lave à l'alcool.

Nous avons montré que cette technique d'isolement appliquée à des cultures d'*H. pertusis* n'ayant pas subi l'action du lysozyme permet,

malgré cela, d'isoler une quantité importante de poly-holoside colloïdal. Cette fraction tire son origine des substances mucoïdes excrétées en abondance par les bacilles. Nos expériences nous ont permis d'en déterminer la quantité. Si la technique que nous venons de rappeler est appliquée intégralement à la même culture du bacille de BORDET, c'est-à-dire sans omettre l'action du lysozyme, on obtient alors, ainsi que nous l'avons montré une quantité bien supérieure de substance polyosidique en fin d'opération. La détermination quantitative permet de montrer que l'on obtient dans ces conditions environ 30 % de plus de produit final que lorsque l'on opère en absence de l'enzyme. Nous interprétons ces résultats de la façon suivante le lysozyme a permis la diffusion et la dissolution des substances glucidiques incluses à l'intérieur des corps microbiens en détruisant ces derniers par une action qui lui est propre.

Cette technique nous a permis d'isoler, à partir du produit de culture recueilli sur sept grands flacons de Roux, des quantités de l'ordre de 400 mg à 500 mg de la substance dont nous avons poursuivi l'étude de la constitution chimique. Dans cette partie de notre travail nous avons établi les faits suivants :

L'analyse élémentaire qualitative nous a permis de montrer qu'il s'agissait d'une substance de nature organique constituée de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote, ainsi que d'une faible proportion de soufre. Nous devons souligner que la teneur en azote est assez élevée puisque nous l'avons trouvée de l'ordre de 7 p. 100. Le produit ne réduit pas directement la liqueur de Fehling mais cette réaction devient fortement positive à la suite d'une hydrolyse acide.

Cette hydrolyse réalisée selon les conditions que nous avons précisées nous a permis d'obtenir une liqueur dans laquelle nous avons identifié divers éléments de constitutions.

Les aldohexoses représentent 50 p. 100 de la substance. Parmi ceux-ci le glucose existe en quantité prédominante. Nous l'avons isolé sous la forme parfaitement caractéristique de son osazone. Aucune confusion ne peut être commise quant à l'origine de cette osazone puisque par ailleurs, nous avons montré que les réactions caractéristiques du mannose, du fructose et de la glucosamine se sont révélées négatives lorsque l'on cherche à les appliquer à notre hydrolysate. Signalons également l'absence des pentoses et des acides uroniques. Nous avons tenu cependant à nous assurer de l'éventuelle présence de faibles quantités d'aldohexoses différents. La spectrophotométrie des solutions colorées obtenues à la suite de la réaction de l'orcinol en milieu sulfurique sur notre hydrolysate nous a montré que nous devons admettre la présence de faibles quantités d'un autre aldose que le glucose.

Toujours par la même méthode la comparaison des spectres obtenus à partir de mélange de glucose et de faibles quantités de galactose, nous a permis de considérer comme très probable la présence de ce dernier aldose.

C'est dans le but d'apporter plus de précision à cette dernière indication que nous avons fait appel à l'analyse des constituants glucidiques de l'hydrolysate par la méthode de la chromatographie sur papier. Soulignons qu'à cette occasion nous avons mis au point une technique générale permettant de fixer et d'intensifier les taches qui constituent les chromatogrammes. Ici encore et en confrontant toujours nos résultats avec ceux obtenus avec des solutions pures de glucose et de galactose, nous avons été amenés à confirmer la présence d'une faible quantité de galactose à côté du glucose.

L'ensemble de ces faits établit la nature polysidique colloïdale comme étant la plus caractéristique de la substance étudiée.

La présence d'une quantité assez importante d'azote dans notre produit (7 p. 100 environ) nous a incités à en rechercher l'origine. La mise en évidence des constituants protidiques n'a soulevé aucune difficulté particulière. Les réactions caractéristiques de certains amino-acides nous ont permis de les mettre en évidence dans nos hydrolysats. Celui-ci contient en effet de la tyrosine (réaction de Millon) de l'arginine (réaction de Sakaguchi)... Enfin ici encore la chromatographie sur papier nous a permis d'identifier, en outre, avec certitude, les acides aminés suivants : (ac aspartique - ac. glutamique - sérine - glycine - thréonine - alanine).

Ainsi donc la substance que nous avons isolée est loin d'être un polysaccharide pur. On doit admettre qu'elle est constituée soit par un mélange, soit par la combinaison d'environ 50 p. 100 de glucides (polyholoside colloïdal) et de 43 p. 100 de protéides de caractère protéique.

A ces résultats sur la constitution chimique de notre substance nous ajouterons que nos recherches, ayant pour but de mettre en évidence des bases puriques et pyrimidiques, se sont révélées négatives. Rappelons par ailleurs l'absence d'acide phosphorique et des pentoses. Ces dernières données s'accordent pour démontrer l'absence de tout constituant de nature nucléique. Nous sommes donc en présence d'un produit très différent de celui isolé par OVEREND et Col. (76) dans lequel ces auteurs ont mis en évidence à côté des acides nucléiques de fortes quantités de polyholosides. Cette divergence nous paraît devoir être mise sur le compte de l'action particulière du lysozyme, point par lequel notre technique se différencie de celle des auteurs cités ci-dessus.

La technique d'isolement que nous avons utilisée se caractérise essentiellement par le fait qu'elle met en œuvre des procédés qui n'apparaissent pas comme susceptibles de dénaturer profondément les polyosides. Aussi avons-nous pensé que notre substance pouvait conserver les propriétés immunologiques que d'autres auteurs ont déjà mises en évidence en ce qui concerne les polyosides d'*H. pertusis*. Rappelons que des substances de cette nature ont été utilisées aux Etats-Unis. Les recherches que nous avons entreprises dans cette voie nous ont permis de confirmer ce point de vue. Les faits que nous avons acquis au cours de notre expérimentation portant uniquement sur les animaux, sont résumés ci-dessous.

Des injections répétées de notre produit à des lapins, soit par la voie intraveineuse, soit par la voie hypodermique, nous ont permis de faire apparaître des anticorps spécifiques dans le sang de ces animaux. En effet, le sérum de lapin ainsi préparé provoque une agglutination des bacilles *H. pertusis* même lorsqu'il est dilué au 1/10.000°. Il y a lieu de noter que l'injection de notre produit en solution alcaline permet d'obtenir un sérum dont le pouvoir agglutinant est toujours très inférieur (le taux d'agglutination ne dépasse jamais le 1/100°).

Ceci montre l'action dénaturante des alcalis et justifie la précaution que nous avons prise de ne jamais les faire intervenir au cours de notre technique d'isolement.

Il est également intéressant de noter que l'administration de notre produit par instillation nasale au lapin permet, quoique à un degré moindre (taux d'agglutination n'atteignant que le 1/1.000°), d'obtenir un sérum agglutinant.

Nous ne saurions conclure de cette expérience que notre produit représente un véritable antigène ; cependant, on ne saurait lui refuser la propriété d'haptène spécifique.

En outre, le sérum de lapin, préparé comme cidessus, permet de combattre l'infection expérimentale provoquée par l'injection de dose léthale d'*H. pertusis* à la souris. Il se comporte, dans ce cas, comme un sérum à action curative.

Enfin, notre produit permet également de protéger des souris contre l'administration de doses léthales de germes. En effet, nous avons montré que les animaux ayant subi des injections intrapéritonéales répétées de la substance que nous avons isolée, résistent remarquablement à l'inoculation d'une suspension d'*H. pertusis*. Le produit se comporte, dans ce cas, à la façon d'un vaccin.

L'ensemble de ces résultats met en évidence les propriétés immuno-

giques du complexe glucido-protidique que nous avons extrait d'*H. pertusis*. Il est important de souligner qu'au cours des expériences de cette nature nous n'avons jamais observé d'accidents toxiques généraux chez nos animaux. En outre, nous n'avons jamais observé de lésions nécrotiques au point d'injection.

Notre substance est donc dépourvue à la fois de toxicité et des impuretés nécrosantes qui sont caractéristiques des sécrétions d'*H. pertusis*. Une seule question demeure obscure à la suite de nos recherches : elle consiste en la difficulté qu'il y a à rapporter les propriétés immunologiques de notre substance, soit à la fraction glucidique seule, soit à la fraction protéique.

Il semble cependant, d'après les recherches antérieures, que la fraction glucidique ait une importance prépondérante et représente un haptène spécifique. Néanmoins, on ne saurait refuser à la fraction protéique la possibilité de jouer un rôle non négligeable et consistant à réaliser un véritable antigène par sa copulation avec la fraction glucidique. De nouvelles recherches paraissent indispensables pour élucider ce problème.

En résumé, les principaux résultats de notre travail consistent :

- premièrement à avoir mis en évidence une technique d'isolement d'un produit d'origine microbienne de nature glucido-protidique grâce à l'intervention du lysozyme ;
- deuxièmement, en l'acquisition de données aussi précises que possible sur la constitution chimique de la substance ainsi isolée ;
- troisièmement, en la mise en évidence des propriétés immunologiques de cette substance qui permet d'obtenir un sérum préventif et curatif vis-à-vis d'*H. pertusis*, la vaccination paraissant être possible. Ces données se limitent à une expérimentation purement animale sur le lapin et la souris.

Vu, le Président du Jury :
Professeur C. DUMAZERT.

Vu et approuvé :
Le Doyen : G. MORIN.

Vu et permis d'imprimer :
Aix, le avril 1953
LE RECTEUR

BIBLIOGRAPHIE

1. — **ABAHAM (E.-P.)**. — Biochem. J., 1939, 33, 622.
2. — **ALDERTON (G.)**, **FEVOLD (H.-L.)**. — J. Biol. Chem., 1946, 164, 1.
3. — **ALDERTON (G.)**, **WARD (W. H.)**, **FEVOLD (H. L.)**. — J. Biol. Chem. 1945, 157, 43.
4. — **ALPERT (S.)**, **MARTIN (G.-J.)**. — Am. J. Digestive. Discases, 1948, 15, 412.
5. — **ANDERSON (T.-F.)**. — J. Cellular. Comp. Physiol., 1945, 25, 17.
6. — **ANDERSON (E.-A.)**, **ALBERTY (R.-A.)**. — J. Phys. and Colloid. Chem. 1948, 52, 1345.
7. — **AVERY (O.-T.)**, **GOEBEL (W.-F.)**. — J. exp. Med., 1933, 58, 731.
8. — **BLOOMFIELD (A.)**. — Bull. Johns. Hopkins. Hops. 1919, 30, 417.
9. — **BOASSON (E.-H.)**. — Thèse Amsterdam, 1937.
10. — **BOASSON (E.-H.)**. — J. immun., 1938, 34, 281.
11. — **BORDET (M.)**. — C. R. Ac. des Sc. Paris, 1924. C. R. Sc. Biol., 1928.
12. — **BOSH - ANDERSON**. — Phys. Review., 1942, 61, 726.
13. — **BOULANGER (P.)**, **BISERTE (G.)**. — Expos. An. Biochim. Med. 11^e série - p. 53, 1950.
14. — **BRUCKNER (J.)**. — Zeit. Phys. Chem., 1943, 277, 181.
15. — **CALIFANO (L.)**. — Bol. Ist. Sicrotes. Milan, 1949, 28, 366. Rendiconti Accad. Nation. 7incer. 1950, 8, 94.
16. — **CARAVEL (L.)**. — Thèse doct. pharmacie Marseille 1953.
17. — **CASELLI (P.)**. — Boll. Ist. Sicroter. Milan, 1943, 22, 366.
18. — **CASELLI (P.)**. — Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1946, 22, 57.
19. — **CASELLI (P.)**. — Arch. Sc. Biol., 1949, 33, 414.
20. — **CASELLI (P.)**, **KERTESZ (D.)**. — Bull. Soc. Chim. Biol. 1950, 32, 583.
21. — **CAVALLO (G.)**. — Boll. Ist. Sicroter. Milan, 1951, 30, 67.
22. — **CRUICKSHANK (J. C.)**, **FREEMANN (C. G.)**. — Lancet., 1937, 11, 567.
23. — **CUTINELLI (C.)**. — Nuovo. Ann. Ig. Microbiol., 1950, 1, 208.
24. — **DUMAZERT (C.)**, **GHIGLIONE (C.)**. — Sous presse.
25. — **DUMAZERT (C.)**, **LEVT (M.)**. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1943, 25, 1274.
26. — **DUMAZERT (C.)**, **POGGI (R.)**. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1939, 21, 1381.
27. — **EPSTEIN (L. A.)**. — Cité par **THOMPSON (R.)**. — Arch. Path. 1940, 30, 1096.
28. — **EPSTEIN (L. A.)**, **CHAIN (E.)**. — Brit. J. exp. Med., 1940, 21, 339.
29. — **ERMOL'eva (Z. V.)**, **BUJANOWSKAYA (I. S.)**. — Zentralbl. f. Baht. 1931, 122, 267.
30. — **ERMOL'eva (Z. V.)**, **BUJANOWKAYYA (I. S.)**. — Acta. Med., U.R.S.S. 1938, 1, 248.
31. — **EVANS (D. A.)**, **MAITLAND (H. B.)**. — J. Path. Bact., 1937, 45, 715.
32. — **FEVOLD (H. L.)**. — Adv. in Protéin. chimestry, 1951, 6, 188.
33. — **FINLAND (M.)**, **SUTLIFF (W. D.)**. — J. exp. Med., 1932, 55, 853.
34. — **FLEMING (A.)**. — Proc. Roy. Soc. London B., 1922, 93, 306.
- 34.b — **FLEMING (A.)**, **ALLISON (U. D.)**. — Proc. R. Soc. London B. 1923, 94, 142.

35. — **FLOSDORF (E. W.), KIMBALL (A. C.).** — J. Immunol., 1940, 39, 287.
J. Immunol., 1940, 39, 475.
36. — **FLOSDORF (E. W.), KIMBALL (A. C.), CHAMBERS (L. A.).** — Proc.
Soc. exp. Biol. N. Y., 1939, 41, 122.
37. — **FLOSDORF (E. W.), KIMBALL (A. C.), DOZOIS (T. F.).** — J. Bact.
1941, 41, 457.
38. — **FRANCIS (T. J.), TILLET (W. S.).** — J. exp. Med., 1930, 55, 853.
39. — **FRAENKEL-CONRAT (H. L.).** — Federation Proc., 1949, 8, 239.
40. — **FRAENKEL-CONRAT (H. L.).** — Arch. Biochem., 1950, 27, 109.
41. — **FRAENKEL-CONRAT (H. L.), COOPER (M.), OLCOTT (H. S.).** — J.
Am. Chem. Soc., 1945, 67, 950.
42. — **FRAENKEL-CONRAT (H. L.), BRANDON (B. A.), OLCOTT (H. S.).** —
J. Biol. Chem., 1947, 168, 99.
43. — **FRAENKEL-CONRAT (H. L.), LEWIS (J. S.), SNELL (N. S.), HIRSCH-
MAN (D. J.).** — J. Biol. Chem., 1950, 186, 23.
44. — **FREEMANN (C. G.).** — Biochim. J., 1943, 37, 601.
45. — **FROMAGEOT (C.).** — C. R. du VIIIe Congrès Clin. Biol. Paris 1948 p. 63.
46. — **FROMAGEOT (C.), ACHER (R.), JUTISZ (M.).** — Bioche. Biophys.
Acta., 1950, 5, 81.
47. — **FROMAGEOT (C.), MONIER (R.), GENDRON (Y.), JUTISZ (M.).** ..
Biochim. Biophys. Acta., 1952, 8, 988.
48. — **FROMAGEOT (C.), PRIVAT de GARILHE (M.).** — Biochim. Biophys.
Acta., 1949, 3, 82.
49. — **FROMAGEOT (C.), PRIVAT de GARILHE (M.).** — Biochim. Biophys.
Acta 1950, 4, 509.
50. — **FROMAGEOT (C.), SCHNECK (G.).** — Bioch. Biophys. Acta., 1950,
6, 113.
51. — **GABRYELSK: (W.), MARCHLEWSKI (L.).** — Biochim. Z. 1932, 250,
385. Biochim. Z., 1933, 261, 393.
52. — **GALSTON.** — Cité par **PROCTOR** et **DICKMAN** (82).
53. — **GOVAERT (J.).** — Bruxelles Medical 1931.
54. — **GORINI (L.), FELIX (F.).** — Biochim. Bioph. Acta., 1953, 10, 128.
55. — **GREEN (F. C.), SCHOEDER (W. A.).** — J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1385.
56. — **HAGEDORN (H. C.), JENSEN (B. N.).** — Bioch. Zeitschr., 1923, 135, 146.
57. — **HALLAVER (C.).** — Zentralbl f. Baht., 1929, 114, 519.
58. — **JERMYN (H. A.), ISHERWOOD (F. A.).** — Bioch. J. 1949, 44, 402.
59. — **JONES (F. T.).** — J. Ann. Chem. Soc, 1948
60. — **JOURNEES de la chromatographie sur papier, mai 1952, Masson (Edit.).**
61. — **JUTISZ (M.), PENASSE (L.).** — BULL. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, 480.
62. — **KERR (S.E.), SERAIDARIAN (K.), WARGON (M.)** — J. Biol. Chem..
1949, 181, 761.
63. — **KERTESZ.** — C. R. Soc. Biol., 1950, 144, 923.
64. — **LASCHTSCHENKO (P.).** — Z. f. Hyg. Infektionshr., 1909, 64, 419.
65. — **LEWIS (C.R.), BENEDICT (S.R.).** — J. Biol. Chem., 1915, 20, 61.
66. — **LAWSON (G.M.).** — Amer. J. Dis., Child., 1933, 47, 1954.
67. — **LINZ.** — C. R. Soc. Biol., 1937.
68. — **LONGSWORTH (L.G.), LANNAN (R.K.), MAC INNES (D.A.).** — J. Am.
Chem. Soc., 1940, 62, 2580.
69. — **MAINIL (J.).** — Annal. Pharm. Franç., 1950, 8, 374.
70. — **MEYER (K.), HANNEL (E.).** — J. Biol. Chem., 1946, 163, 723.
71. — **MEYER (K.), PALMER (J.W.), THOMPSON (R.), KHORAZO (D.).** —
J. Biol. Chem., 1936, 113, 303, 479.

72. — **MILLER (J.J.)**. — Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 1937, 37, 45.
73. — **MORGAN (W.T.J.)**, **PARTRIDGE (S.M.)**. — Bioch. J., 1941, 35, 1140.
74. — **MOSS (J.)**, **MARTIN (G.J.)**. — Am. J. Digestive Disease, 1948, 15, 412.
75. — **NAKAMURA (O.)**. — Z. f. Immunitätsforsch. n. exp. ther., 1923, 38, 425.
76. — **OVEREND (W.G.)**, **STACEY (M.)**, **WEBB (M.)**, **UNGAR (J.)**. — J. Gen. Microb., 1951, 15, 268.
77. — **PALMER (K.J.)**, **BALLANTYNE (M.)**, **GALVIN (J.A.)**. — J. Amer. Chem. Soc., 1948, 70, 906.
78. — **PARTRIDGE (S.M.)**. — Bioch. J., 1948, 42, 238.
79. — **PARKIN, KRALE**. — Am. Heart. J., 1949, 37, 333.
80. — **PASINSKII (A.G.)**, **KASTORSKAYA (T.)**. — C. R. Acad. Sc. U.R.S.S., 1945, 49, 504.
81. — **PIRIE (A.)**. — Brit. J. Exp. Path., 1940, 21, 125.
82. — **PROCTOR (C.M.)**, **DICKMAN (S.R.)**. — Fed. Proc., 1949, 8, 239.
83. — **REYNOLDS (D.M.)**. — Bact. Proceed., 1950, p. 66.
84. — **ROBERTS (E.A.M.)**, **WELLS (A.Q.)**. — Quart. J. Exp. Physiol., 1937, 27, 89.
85. — **ROMANA (F.)**. — Acta Pediatrica Espagnola cité par MAINIL (69).
86. — **SCHIEHMANN (O.)**. — Z. Hyg. Infekt. Kz., 1929, 110, 567.
87. — **SCHIEHMANN (O.)**, **CASPER (W.)**. — Z. Hyg. Infekt. Kz., 1927, 108, 220.
88. — **SCHRÖDER (N.A.)**. — J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 281.
89. — **SMITH (G.N.)**, **STOCKER (C.)**. — Arch. Bioch., 1949, 21, 283.
90. — **SMOLELIS (A.N.)**, **HARTSELL (S.E.)**. — J. Bact., 1949, 58, 731.
91. — **SMOLENS (J.)**, **CHARNEY (J.)**. — J. Bact., 1947, 54, 101.
92. — **SMOLENS (J.)**, **MUDD (S.)**. — J. Immunol., 1943, 47, 155.
93. — **SUZUKI (S.)**. — Arch. f. Hyg., 1911, 74, 345.
94. — **TALLAN (H.H.)**. — Feder. Proc., 1952, 11, 297.
95. — **TALLAN (H.H.)**, **STEIN (W.H.)**. — J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 2976.
96. — **THOMPSON (A.R.)**. — Arch. Path., 1940, 30, 1096.
97. — **THOMPSON (A.R.)**. — Nature, 1951, 168, 390.
98. — **TOURATIER**. — Thèse Pharmacie Marseille 1948.
99. — **TOURNIER**. — Thèse aPris 1948.
100. — **VIOLLE (H.)**. — C. R. Acad. Sc., 1952, 235, 1170.
101. — **WEBB (M.)**. — J. Gener. Micr., 1948, 2, 260.
102. — **WEBB (M.)**. — Ist. Int. Cong. Biol. Chem. Cambridge, 1949.
103. — **WELLSHIMER (H.J.)**, **ROBINOW (C.F.)**. — J. Bact., 1949, 57, 489.
104. — **WETTER (L.R.)**, **DEUTSCH (H.F.)**. — J. Biol. Chem., 1951, 192, 237.
105. — **WOLFF (L.K.)**. — Z. Immunitätsforsch. u. exp. her., 1927, 50, 88.
106. — **WONG (S.C.)**. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1938, 38, 107.
107. — **WONG (S.C.)**, **TUNG (T.)**. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1938, 39, 422.
108. — **ZOZAYA (J.)**, **CLARK (J.)**. — Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 1932, 30, 44 ; J. Exp. Med., 1933, 57, 21.

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Biochimie de la Transméthylation
